

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**IMPACTO DE LA INMIGRACIÓN EN LA ÉPIDEMIA DEL
VIH EN MADRID: PERSPECTIVAS EPIDEMIOLÓGICA,
CLÍNICA Y MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

Gonzalo Yebra Sanz

Madrid, 2012

TESIS DOCTORAL

Impacto de la Inmigración en la Epidemia del VIH en Madrid: perspectivas epidemiológica, clínica y molecular

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid por el licenciado:

D. Gonzalo Yebra Sanz

Directora de Tesis:

Dra. África Holguín Fernández

Doctora en Biología. Investigadora del Sistema Nacional de Salud. Responsable del Laboratorio de Epidemiología Molecular del VIH-1. Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

VºBº de la Directora de Tesis:

ABREVIATURAS

μl	microlitros
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADVP	Adictos a drogas por vía parenteral
AF	Análisis filogenético
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARV	Antirretroviral(es)
BLAST	Herramienta de búsqueda básica en alineamientos locales
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU.
céls	Células
CRF	Forma(s) recombinante(s) circulante(s)
CV	Carga viral del VIH-1
ELISA	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
HPD	Intervalo de la mayor densidad posterior
HSH	Hombres que tienen sexo con hombres
Htsex	Heterosexual
IAS-USA	Sociedad Internacional sobre el Sida de EE. UU.
IC	Intervalo de confianza
IgE	Inmunoglobulina E
IP	Inhibidores de la proteasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido
ITINAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido
ITS	Infecciones de transmisión sexual
kb	Kilobases
LANL	Laboratorio Nacional de Los Álamos, EE. UU.

LiPA	Ensayo de sondas en línea (<i>Line Probe Assay</i>)
log	Logaritmo decimal
LTR	Repeticiones largas terminales
m	Minutos
ML	Máxima verosimilitud (<i>maximum likelihood</i>)
ml	Mililitros
MRCA	Ancestro común más reciente
MRT	Mutaciones de resistencia transmitidas
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.
NJ	Unión por vecindad (<i>neighbour-joining</i>)
NS	Estadísticamente no significativo
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Proteasa
s	Segundos
Sida	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TAM	Mutaciones de análogos de timidina
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TI	Transcriptasa inversa
UE	Unión Europea
UI	Unidades internacionales
URF	Forma(s) recombinante(s) única(s)
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VIS	Virus de la inmunodeficiencia del simio
VIII	

FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES FRENTE AL VIH

Inhibidores de la proteasa ("/r" indica coadministración con ritonavir en baja dosis como potenciador farmacológico)

ATV/r	Atazanavir
DRV/r	Darunavir
FPV/r	Fosamprenavir
IDV/r	Indinavir
LPV/r	Lopinavir
NFV	Nelfinavir
SQV/r	Saquinavir
TPV/r	Tipranavir

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleós(t)ido

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AZT	Zidovudina
d4T	Estavudina
ddI	Didanosina
FTC	Emtricitabina
TDF	Tenofovir

Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleós(t)ido

EFV	Efavirenz
ETR	Etravirina
NVP	Nevirapina

AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutámico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptófano
Y	Tirosina

ÍNDICE |

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen en Inglés	1
Introducción	5
Biología del VIH.....	7
Epidemiología del VIH.....	8
VIH en inmigrantes.....	10
Variantes genéticas del VIH.....	11
Generalidades del tratamiento antirretroviral.....	15
Implicaciones de la presencia de variantes no-B del VIH-1.....	16
Objetivos	19
Capítulo 1: Diferencias clínicas y diversidad viral entre nuevos diagnósticos de VIH-1 africanos y no africanos.....	23
Antecedentes.....	25
Materiales y métodos.....	26
Resultados.....	29
Discusión.....	38
Capítulo 2: Cambios en la tasa de resistencia transmitida en población infectada por el VIH-1 según su origen.....	41
Antecedentes.....	43
Materiales y Métodos.....	45
Resultados.....	47
Discusión.....	54
Capítulo 3: Caracterización filogenética y demográfica de la transmisión del VIH-1 en Madrid.....	59
Antecedentes.....	61
Materiales y Métodos.....	62
Resultados.....	67
Discusión.....	73
Capítulo 4: Influencia de la presencia de variantes no-B en herramientas informáticas de uso clínico.....	79
Antecedentes.....	81
Materiales y Métodos.....	83
Resultados.....	86

Discusión	98
Conclusiones	105
Bibliografía	109
Anexo I: Recursos en internet	123
Páginas web utilizadas	125
Algoritmos de interpretación genotípica de resistencias	126
Herramientas automatizadas de subtipaje del VIH-1.....	126
Anexo II: Material adicional.....	129
Estructura y distribución de los CRF incluidos en esta Tesis.....	131
Listados de mutaciones de resistencia a antirretrovirales utilizados	133
Anexo III: Publicaciones.....	135
Publicaciones surgidas de esta Tesis	137
Otras publicaciones	137

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.....	28
Tabla 1.2: Datos clínicos y demográficos de los nuevos diagnósticos VIH según su origen.	30
Tabla 1.3: Infecciones parasitarias en pacientes subsaharianos VIH-1 positivos..	32
Tabla 1.4: Variantes del VIH-1 entre los nuevos diagnósticos con subtipo disponible según su origen.	34
Tabla 1.5: Caracterización de las variantes del VIH-1 en los pacientes africanos..	35
Tabla 2.1: Variables metodológicas que influyen en los estudios de MRT.....	44
Tabla 2.2: Características de pacientes infectados con virus con MRT y pacientes con virus silvestre.....	48
Tabla 3.1: Características de los pacientes incluidos o excluidos de clusters de transmisión detectados mediante análisis filogenético en <i>pol</i>	68
Tabla 3.2: Características de los tres clusters de secuencias virales encontrados incluyendo transmisión de resistencias independiente del tratamiento.....	74
Tabla 4.1: Sustituciones en posiciones de resistencia secundaria a IP con frecuencia significativamente diferente en subtipo B y formas no-B del VIH-1.....	88
Tabla 4.2: Porcentaje de secuencias asignadas a cada nivel de resistencia según el algoritmo y la familia de ARV para variantes B y no-B del VIH-1.	90

Tabla 4.3: Tasa de discordancias entre los cinco algoritmos de interpretación de resistencia genotípica en variantes B y no-B del VIH-1.....	91
Tabla 4.4: Sensibilidad de las herramientas automatizadas de subtipaje respecto al análisis filogenético.....	94
Tabla 4.5: Eficacia del subtipaje de los recombinantes del VIH-1 según las 7 herramientas automatizadas comparadas.....	95
Tabla 4.6: Tasas de clasificación errónea del subtipo B y las variantes no-B del VIH-1 según las 7 herramientas automatizadas de subtipaje.	96
Tabla 4.7: Estudios de las limitaciones de las herramientas automatizadas de subtipaje que incluyen variantes no-B del VIH-1.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I.1: Estructura del virión y genoma del VIH	7
Figura I.2: Ciclo replicativo del VIH.	9
Figura I.3: Esquema de la clasificación de las variantes del VIH.....	13
Figura I.4: Distribución global de los subtipos y recombinantes del grupo M del VIH-1 en el periodo 2004-2007.....	14
Figura 1.1: Variantes del VIH-1 que infectan al grupo de subsaharianos.....	34
Figura 1.2: Ejemplo de determinación del subtipo del VIH-1 mediante análisis filogenético en un triple recombinante.	37
Figura 2.1: Prevalencia de MRT a cada familia de fármacos según el origen de los pacientes.....	47
Figura 2.2: Tendencias de la prevalencia de MRT en el tiempo en función de características epidemiológicas o virológicas.	49
Figura 2.3: Prevalencia de mutaciones individuales entre los pacientes infectados por virus portadores de MRT.....	52
Figura 2.4: Interpretación genotípica de la susceptibilidad a fármacos en los casos de secuencias <i>pol</i> con MRT.	53
Figura 3.1: Esquema de la estructura de un cluster de secuencias genéticas con sus elementos.	66
Figura 3.2: Número de clusters de transmisión identificados según el límite en la edad utilizado para la definición de cluster.....	67
Figura 3.3: Proporción de pacientes de la cohorte incluidos en clusters de transmisión según sus características.	69
Figura 3.4: Número de eventos de transmisión por año y variante viral.	71

Figura 3.5: Ejemplos de árboles filogenéticos datados reconstruidos a partir de la población de estudio.....	72
Figura 4.1: Sustituciones en la PR y la TI asociadas con resistencia a fármacos ARV según la variante del VIH-1.....	87
Figura 4.2: Distribución de las variantes del VIH-1 en la cohorte CoRIS empleando distintos métodos de subtipaje.	97

RESUMEN EN INGLÉS

HIV-1 diagnosis is increasing in immigrants residing in Spain. This fact is changing the current situation of the HIV epidemic in Madrid and affecting both traditional and molecular epidemiology. The Community of Madrid represents a challenge for the control of HIV epidemic in Spain given its high HIV prevalence and increasing proportion of immigrant people.

In this Thesis, different studies focusing on the impact at diverse levels of the presence of HIV-positive immigrants in Madrid are presented. A combination of molecular, phylogenetic and demographic approaches was used. According to the results, HIV-infected patients in this cohort in Madrid presented very different profiles according to their geographical origin. Subjects from sub-Saharan Africa showed a more advanced immunodeficiency, co-existence of parasitic diseases, and a HIV-1 infection caused by a large diversity of non-B and recombinant variants. They also presented an increasing prevalence of transmitted drug resistance among those who remained untreated. In addition, the mutational pattern differed across groups, reflecting the influence of the treatment strategies in their countries of origin. On the other hand, autochthonous and Latin American HIV-positive populations were more similar, showing both of them decreasing rates of transmitted drug resistance. Nevertheless, these factors did not seem to have an influence on the antiretroviral treatment effectiveness. HIV transmission networks were also described, showing that one out of five HIV-infected patients was epidemically linked. The probability of inclusion in these networks was high for Spaniards and Latin Americans but quite low for sub-Saharan Africans. This determined also different trends for the HIV transmission across viral variants. The increasing presence of diverse HIV variants, especially recombinants, impaired the performance of different computational tools widely used in clinical settings, since they misinterpreted the great variability that HIV-1 clades naturally present.

In summary, different approaches for the study of HIV sequences generated routinely are powerful and very valuable tools that, together with epidemiological and clinical surveillance, can reveal crucial knowledge for designing prevention campaigns aimed for vulnerable collectives in the fight against HIV/AIDS such as immigrant people.

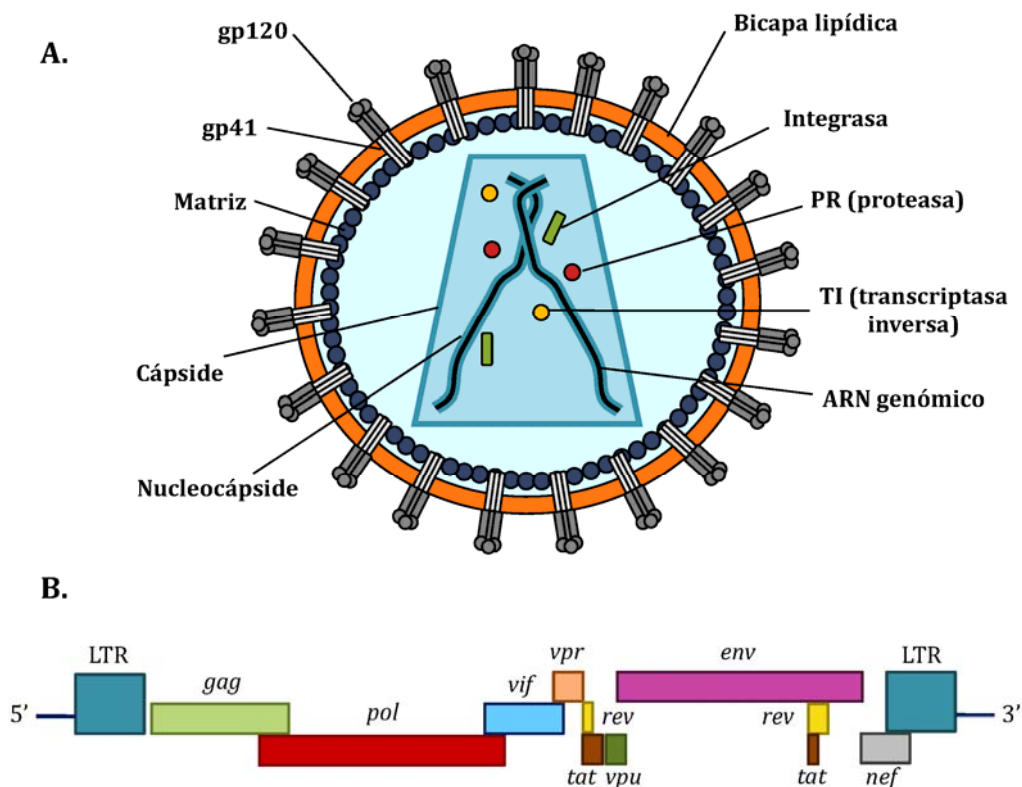
INTRODUCCIÓN |

BIOLOGÍA DEL VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente infeccioso causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida). Es un virus ARN clasificado dentro de la familia de los retrovirus humanos (*Retroviridae*) y perteneciente al género *Lentivirus* (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Su origen se remonta a múltiples transmisiones zoonóticas del virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) desde diversos primates no humanos que tuvieron lugar en África central y occidental a principios del siglo XX (Worobey *et al.*, 2008).

La estructura y organización genómica del VIH se muestran en la **Figura I.1**. El virión está constituido por una envoltura externa (bicapa lipídica) en la cual se insertan la glicoproteína de superficie gp120 y la glicoproteína transmembrana gp41. Bajo la envoltura se sitúa la matriz proteica, y en el interior se encuentra la cápside. Dentro de ésta se localizan tanto las enzimas virales como el material genético del virus, constituido por dos cadenas sencillas de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9,8kb (Muesing *et al.*, 1985) asociadas a las proteínas de la nucleocápside.

Figura I.1: Estructura del virión (A) y genoma del VIH (B).



El genoma del VIH contiene tres regiones codificantes principales: a) la región *gag*, que codifica principalmente las proteínas estructurales que conforman la matriz, la cápside y la nucleocápside; b) la región *pol*, que codifica las enzimas responsables de la maduración (proteasa, PR), de la transcripción inversa (transcriptasa inversa, TI) y de la integración (integrasa); y c) la región *env*, que codifica el precursor de las glicoproteínas de la envoltura. Además, en el genoma del VIH-1 hay otros seis genes adicionales (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) que codifican proteínas que regulan la expresión de genes virales o representan factores de virulencia. En el VIH-2, el gen *vpu* está sustituido por *vpx*. En ambos extremos del genoma se localizan las secuencias repetidas largas (LTR), no codificantes, donde se encuentran regiones reguladoras esenciales para la replicación del virus (Gallo *et al.*, 1988; Emerman y Malim, 1998).

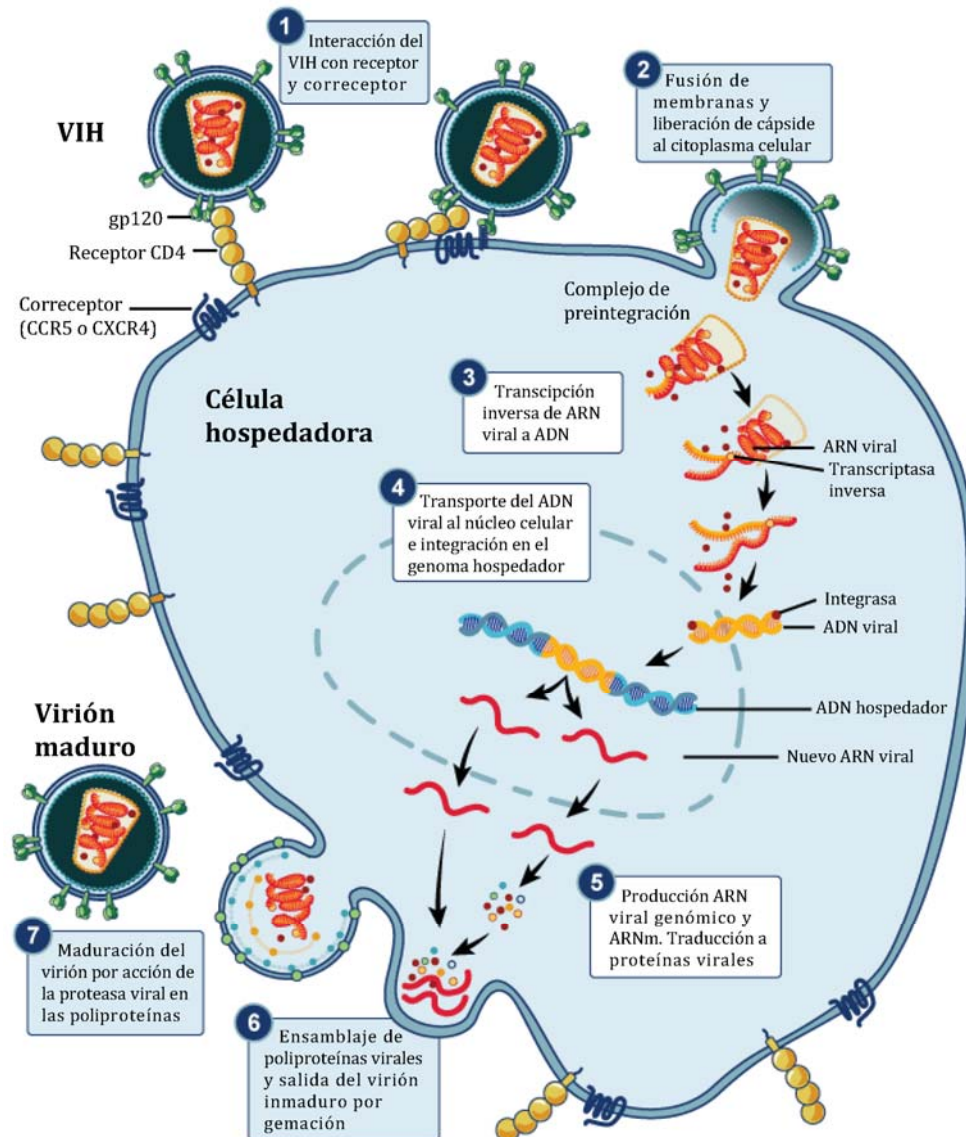
En el ciclo replicativo del VIH se resumen las siguientes etapas (**Figura I.2**): 1) interacción del virus con la célula diana (linfocitos T CD4+ principalmente) por la unión de la glicoproteína gp120 de la envoltura viral con el receptor celular CD4 y un receptor de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) que actúa como correceptor; 2) fusión de las membranas viral y celular y liberación al citoplasma de la cápside viral; 3) transcripción inversa del ARN genómico viral y formación del ADN complementario de doble cadena mediado por la TI; 4) transporte del ADN al núcleo celular e integración en el genoma de la célula hospedadora por la acción de la integrasa; 5) transcripción de los genes virales integrados y procesamiento de los transcritos para dar lugar a ARN genómico y ARN mensajero (ARNm) virales. Traducción de los ARNm a poliproteínas precursoras virales en el citoplasma; 6) ensamblaje de las proteínas virales y salida del virión por gemación, arrastrando parte de la membrana de la célula huésped; 7) maduración por la acción de la proteasa viral que procesa las poliproteínas precursoras para formar el virión infectivo (Levy, 1993).

EPIDEMIOLOGÍA DEL VIH

A finales de 2010, aproximadamente 34 millones de personas vivían infectadas por el VIH en todo el mundo, un 17% más que en 2001(ONUSIDA, 2011). Este aumento es el reflejo de que, a pesar de su disminución progresiva desde finales de

los años 90, los índices de nuevas infecciones por el virus siguen siendo altos. Pero también es debido a la reducción en la mortalidad relacionada con sida, gracias a la expansión de la terapia antirretroviral. Por ello, se considera que el crecimiento general de la epidemia global de VIH/sida parece haberse estabilizado.

Figura I.2: Ciclo replicativo del VIH.



Adaptado del National Institute of Allergy and Infectious Diseases, EE. UU. (<http://www.niaid.nih.gov>).

África subsahariana sigue siendo la región más afectada por el VIH. En 2010, el 68% (22,9 millones) de todas las personas infectadas en el mundo residían en esta región, que representa solo el 12% de la población mundial. A pesar de ello, el número total de nuevas infecciones por el VIH en África subsahariana ha

disminuido desde los 2,6 millones estimados en el punto máximo de la epidemia en 1997 hasta los 1,9 millones en 2010. En Europa, el número de casos de sida sigue reduciéndose gracias a la eficacia de los tratamientos de acceso universal. En 2010, la tasa de nuevos diagnósticos por VIH en el total de la Unión Europea (UE) fue de 5,7 casos por cada 100.000 habitantes. La mayor proporción (38%) de los casos en Europa se da en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) seguido por individuos infectados por contacto heterosexual (24%) y por uso de drogas inyectables (4%) (ECDC, 2011).

En España, la epidemia de VIH ha sufrido cambios drásticos en las últimas dos décadas. Se ha pasado de tener, en los años 90, una epidemia de grandes proporciones concentrada especialmente en los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) españoles, a una epidemia en la actualidad en la que, como en el resto de la UE, el VIH se transmite principalmente a través de contacto sexual, especialmente entre HSH, que suponen el 46% de los nuevos diagnósticos en 2010 (SINIVIH, 2011). En los últimos años, la incidencia de nuevos diagnósticos por VIH se ha estabilizado en alrededor de 9 nuevas infecciones por 100.000 habitantes por año, una tasa mayor que en el total de la UE pero similar a la de otros países de nuestro entorno.

VIH EN INMIGRANTES

En España se ha producido un incremento significativo en la proporción de inmigrantes dentro de la población general, pasando del 1,6% en 1998 al 12,2% en 2010 (INE, 2011). En consecuencia, el número de nuevos diagnósticos por VIH en población inmigrante ha aumentado. Sin embargo, este número no es proporcional a la representación de los inmigrantes en población general, puesto que en 2009 el 38% de los nuevos diagnósticos de infección por el VIH se realizó en personas originarias de otros países. Este porcentaje fue aún mayor (47%) en la Comunidad de Madrid (Díez *et al.*, 2011), donde el 16,7% de la población es de origen inmigrante. En muchos países de nuestro entorno, los inmigrantes también representan un porcentaje cada vez mayor entre la población infectada por VIH. En todos ellos, la epidemia entre los inmigrantes es, comparada con los pacientes autóctonos, más joven, con mayor representación femenina, y de transmisión

preferentemente heterosexual, y afecta sobre todo a personas procedentes del África subsahariana. En España, la procedencia de los inmigrantes es más variada y tiene algunas diferencias con otros países de Europa. Tras la comunidad proveniente de otros países de la UE, las personas de Latinoamérica (31% de los inmigrantes en 2010) son las más numerosas, vienen de regiones con prevalencias de VIH similares a la española, y sufren menos barreras lingüísticas y una menor distancia cultural respecto al país de acogida (Caro-Murillo *et al.*, 2010).

Esta mayor proporción de los inmigrantes en población VIH positiva comparada con su presencia relativa en población general se debe, en parte, a la estabilización de la incidencia de nuevas infecciones en personas autóctonas. La migración por sí misma incrementa el riesgo para la infección por VIH y sus consecuencias, ya que siempre conlleva algún grado de desestructuración del entorno de las personas debido al desarraigo, estigmatización, precariedad laboral y dificultades de adaptación. Además, muchos de los inmigrantes en Europa provienen de regiones de alta presencia del VIH, como África subsahariana y Europa del este, donde puede existir un riesgo de infección considerablemente mayor que en el lugar de acogida.

VARIANTES GENÉTICAS DEL VIH

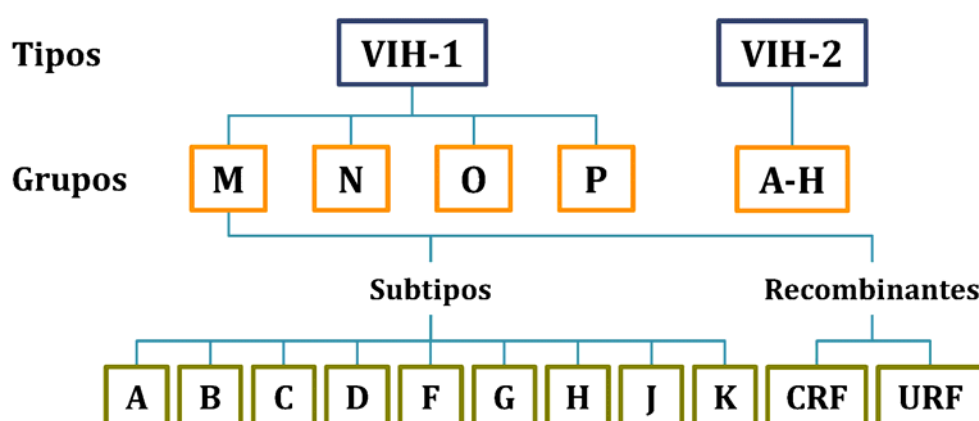
Una de las principales características del VIH es su gran heterogeneidad genética, debida a la combinación entre su alta replicación y a sus elevadas tasas de mutación y recombinación. Se calcula que se producen y destruyen entre 10^{10} y 10^{12} nuevos viriones cada 2,5 días, que es el tiempo transcurrido entre generaciones virales (Perelson *et al.*, 1996). Mientras tanto, por cada ciclo replicativo y genoma ARN se producen, aproximadamente, 0,3 sustituciones nucleotídicas y de 2 a 3 eventos de recombinación (Jetzt *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2002). Las mutaciones, incluyendo inserciones y deleciones, permanecen en el genoma debido a que la TI carece de actividad correctora de errores, siendo incapaz de eliminar los nucleótidos erróneamente incorporados durante la transcripción inversa. Todo ello resulta en la excepcional diversidad que se observa tanto a nivel intra-paciente como a nivel poblacional.

En primer lugar, dentro de un individuo infectado el virus se organiza como una población altamente heterogénea de distintas variantes con genomas íntimamente relacionados pero no iguales. Esta estructura poblacional, llamada “cuasiespecie viral”, se caracteriza por un proceso constante de generación de mutantes, competición entre ellos y selección positiva y/o negativa. Estos procesos tienen como resultado la dominancia del genoma o genomas con mayor eficacia biológica o *fitness* (variante mayoritaria) rodeado de un amplio espectro de mutantes (variantes minoritarias) con un extenso rango de fenotipos (Briones y Domingo, 2008). De hecho, en teoría, todas estas variantes circulantes pueden integrarse en forma de provirus en las células y así estar representadas en el reservorio de linfocitos latentemente infectados. Si el medio que les rodea (intra-paciente) cambiase, por ejemplo por la respuesta inmune o la exposición a fármacos ARV, se seleccionaría por selección positiva la variante que llevara aquellos cambios que supusieran una ventaja competitiva en esa nueva situación.

A nivel global, la variabilidad del virus se traduce en la aparición de numerosas cepas (**Figura I.3**), que son el objeto de estudio de la epidemiología molecular. Basándose en su homología genética, el VIH se clasifica en dos tipos: 1 y 2 (Robertson *et al.*, 2000). A su vez, el VIH tipo 1 (VIH-1), que es el dominante en la pandemia y más patogénico y transmisible que el VIH-2, se divide en cuatro grupos: M (*main* o principal), N (no-M, no-O), O (*outlier* o atípico) y P. El VIH-2 (que incluye 8 grupos, A-H), así como los grupos N, O y P del VIH-1, están restringidos a África occidental y central o a casos aislados originarios de esa región. Solo el VIH-1 grupo M se ha expandido desde África, el origen de la pandemia, al resto de continentes. A su vez, este grupo M incluye 9 subtipos (denominados por letras: A-D, F-H, J y K) así como recombinantes entre ellos. Estos últimos se originan por fenómenos de recombinación derivados de una coinfección virales (infecciones sucesivas) o una superinfección (infecciones simultáneas) por 2 subtipos diferentes del virus en un mismo hospedador, lo que ocurre en lugares donde hay una alta tasa de infección por VIH y circulan a la vez múltiples cepas del virus. Estos recombinantes se conocen como Formas Recombinantes Circulantes o CRF cuando al menos tres muestras no relacionadas epidemiológicamente son monofiléticas (es decir, forman una agrupación filogenética consistente) y

presentan igual patrón de recombinación a lo largo de su genoma. Hasta el momento se han descrito 51 CRF distintos (el **Anexo II** muestra la estructura de los CRF nombrados en esta Tesis). El resto de recombinantes, conocidos como Formas Recombinantes Únicas o URF, son aquellos encontrados aisladamente y cuyos puntos de recombinación a lo largo del genoma son diferentes de los encontrados en los CRF. Si los URF se transmiten sucesivamente y se extienden entre la población, pueden dar lugar a nuevos CRF. De hecho, ante el incremento exponencial en el número de CRF descritos, algunos autores han propuesto agrupar aquellos CRF similares en familias de recombinantes (Zhang *et al.*, 2010).

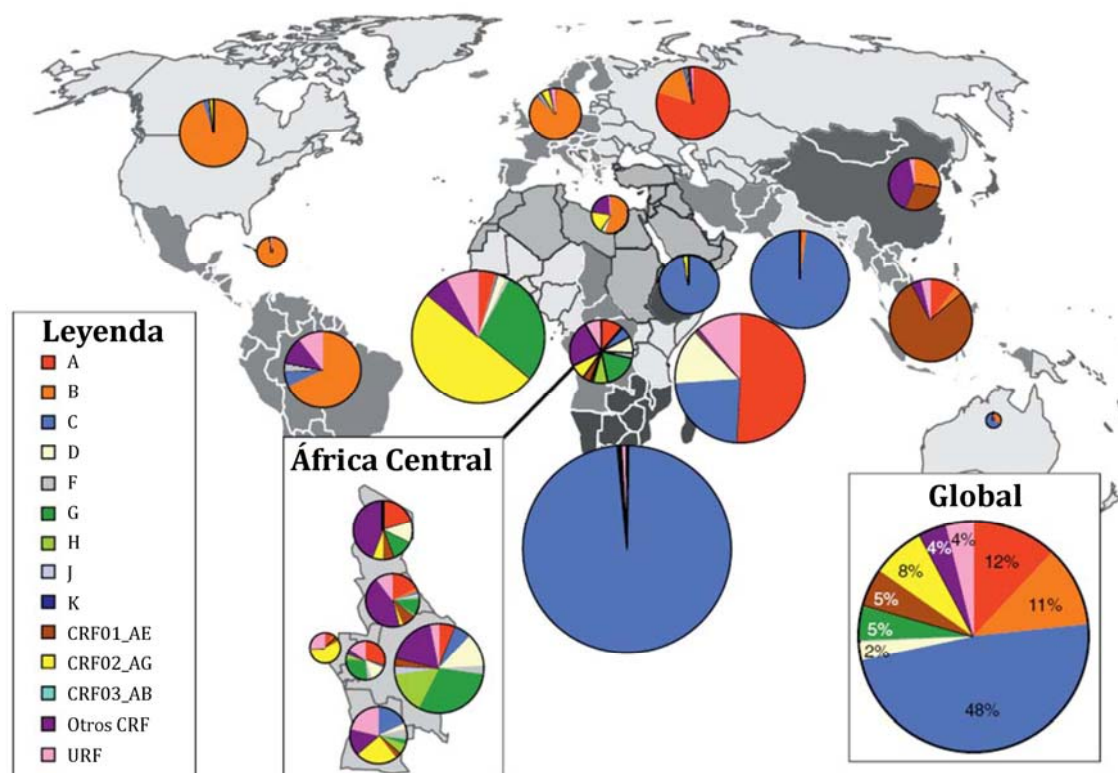
Figura I.3: Esquema de la clasificación de las variantes del VIH.



La distribución mundial de las distintas variantes dentro del grupo M del VIH-1 es heterogénea (Hemelaar *et al.*, 2011) (**Figura I.4**). En África central, por ser el epicentro de la pandemia, coexisten gran número de variantes. Mientras, en el resto del mundo la distribución del VIH es probablemente debida a diferentes fenómenos de efecto fundador, es decir, la expansión de una variante concreta por ser la primera en llegar. Así, el subtipo C predomina en África del sur y oriental y también en la India, el subtipo A en los países de la antigua Unión Soviética y el recombinante CRF01_AE en el sudeste asiático. En las áreas más desarrolladas, como Europa occidental y Norteamérica, el subtipo B es el predominante, y aunque supone solo el 11% de las infecciones por VIH-1 a nivel mundial, es la variante más estudiada y utilizada como modelo para el diseño y desarrollo de fármacos, vacunas, ensayos diagnósticos, y gran parte de la investigación básica. En contrapunto, se agrupó al resto de subtipos del grupo M del VIH-1, así como a todos los recombinantes, denominándolos “variantes no-B” del VIH-1. Éstas son las

mayoritarias a nivel global (responsables de 30 de los 34 millones de infecciones en el mundo) y especialmente en las regiones con menos recursos. A pesar de esto, estas variantes no están aún suficientemente estudiadas.

Figura I.4: Distribución global de los subtipos y recombinantes del grupo M del VIH-1 en el periodo 2004-2007.



Adaptado de (Hemelaar et al., 2011).

Una de las consecuencias del aumento en la inmigración y otros movimientos poblacionales ha sido la introducción de variantes no-B en las zonas con recursos desde regiones en desarrollo. De hecho, su presencia es cada vez mayor en los países desarrollados tras su introducción y posterior expansión en pacientes tanto inmigrantes como autóctonos. La proporción de subtipos no-B y recombinantes entre los nuevos diagnósticos varía entre los países, alcanzando incluso el 50% en Francia o Bélgica (Frange *et al.*, 2008; Vercauteren *et al.*, 2009; Brennan *et al.*, 2010; Hemelaar *et al.*, 2011; von Wyl *et al.*, 2011). En España, la proporción de variantes no-B también está en alza, y hoy suponen el 10-15% de las infecciones por VIH, si bien esta cifra supera el 90% en inmigrantes subsaharianos. La mayoría de cepas no-B encontradas en nuestro país son formas recombinantes. De hecho, la variante no-B más frecuente en prácticamente todos los estudios realizados

España es el CRF02_AG (Holguín *et al.*, 2008a; González-Alba *et al.*, 2011; Yebra *et al.*, 2012). Particularmente, en Galicia se detectó un brote entre ADVP producido por el subtipo G procedente de Portugal, que conllevó la formación en esta región de recombinantes entre B y G (Delgado *et al.*, 2002). En la actualidad, algo similar está ocurriendo también en esta región con el subtipo F procedente de Brasil entre HSH (Thomson *et al.*, 2012). En general, en diversos estudios se han detectado en España casos de infección por todos los subtipos no-B del VIH-1 y múltiples variantes recombinantes incluso entre CRF distintos (Holguín *et al.*, 2008d).

GENERALIDADES DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL

El ciclo infectivo del VIH muestra varios puntos clave que han sido elegidos para el diseño de fármacos ARV que bloqueen su replicación. Dos de las enzimas fundamentales que intervienen en el mismo, la transcriptasa inversa y la proteasa (pasos 3 y 7, respectivamente, en la **Figura I.2**), han sido elegidas como dianas moleculares idóneas para las primeras familias de fármacos ARV, que se podrían denominar como “clásicas”: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos (ITIAN) o no análogos de nucleós(t)idos (ITINAN) e inhibidores de la proteasa (IP). La triple combinación de 2 ITIAN más un tercer fármaco (1 ITINAN o 1 IP) es la base de la actual terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA). A estas familias les han seguido los inhibidores de la entrada, que actúan sobre el receptor o sobre el correceptor (paso 1, **Figura I.2**) y los inhibidores de la integrasa (paso 4, **Figura I.2**). Estas nuevas familias se utilizan como tercer fármaco alternativo. Así, se dispone de un total de 6 familias de fármacos aprobadas en España (GeSIDA, 2012), lo que supone un gran arsenal terapéutico de ARV.

Sin embargo, el TARGA es incapaz de erradicar la infección porque el VIH permanece latente en reservorios celulares en los que elude tanto la respuesta inmunitaria como la acción de los fármacos. Esto implica la necesidad de mantener el tratamiento de por vida, lo que entraña un elevado riesgo de incumplimiento terapéutico y, por consiguiente, de resistencia farmacológica. No obstante, gracias al TARGA una alta proporción de pacientes VIH positivos tienen una calidad de vida prácticamente normal a pesar de los posibles efectos adversos.

Puesto que hasta el momento es imposible su erradicación, el TARGA tiene como objetivo la máxima supresión de la replicación del virus. Ésta se monitoriza con la determinación periódica de la carga viral (CV), es decir, cantidad de virus en plasma sanguíneo, a la que se intenta mantener por debajo de 50 copias de ARN de VIH/ml (1,7 logaritmos). Esta cifra es el límite de detección de la mayoría de las técnicas (si bien las más modernas detectan hasta 20 copias/ml) y con la que se asume que no se seleccionan mutaciones de resistencia. El otro parámetro utilizado para el seguimiento de la infección es el número de linfocitos T CD4+ en sangre. Éste es el marcador principal del riesgo de progresión clínica y de la necesidad del TARGA. La restauración inmunológica, en términos de incremento de los niveles de CD4+, es otro objetivo del tratamiento (GeSIDA, 2012).

Debido a la estructura en cuasiespecie del virus y a la imposibilidad de la supresión completa de su replicación, tras el inicio del tratamiento el VIH puede seleccionar rápidamente variantes preexistentes portadoras de mutaciones que le confieran una reducción de susceptibilidad o incluso resistencia a los fármacos. Se han descrito mutaciones de resistencia para todos los ARV desarrollados hasta el momento, independientemente del gen diana. Estas mutaciones alteran la forma y las propiedades bioquímicas de las proteínas virales, y así son capaces de reducir la actividad del ARV. No obstante, no todas las mutaciones tienen la misma importancia. Para cada fármaco, especialmente para los IP, existen mutaciones principales (*major*), cuya presencia por sí mismas está ligada a la aparición de resistencia, y secundarias (*minor*) que también contribuyen en menor medida a la resistencia pero sólo acompañando a las mutaciones principales (GeSIDA, 2012).

IMPLICACIONES DE LA PRESENCIA DE VARIANTES NO-B DEL VIH-1

La variabilidad genética propia de las variantes no-B podría tener implicaciones para prácticamente cada aspecto de la epidemia. En cuanto al diagnóstico, hace unos años ciertos inmunoensayos, basados en el subtipo B, eran incapaces de detectar determinadas variantes del VIH, por lo que algunos pacientes quedaban sin diagnosticar. Los actuales inmunoensayos pueden detectar todos los subtipos del grupo M del VIH-1, el grupo O y el VIH-2, sin embargo, en regiones con recursos limitados, donde se concentran la mayor parte de las infecciones y además circulan

una gran cantidad de cepas distintas del virus, las pruebas diagnósticas son menos eficientes (Aghokeng *et al.*, 2009). El seguimiento de la enfermedad mediante la estimación de la carga viral también se ve afectado por la variabilidad viral, que pone a prueba las sondas específicas con las que estas técnicas detectan al VIH. Esto provoca que en ocasiones sean incapaces de cuantificar ciertas variantes o las cuantifiquen a la baja (Rouet *et al.*, 2007). Además, la carga viral con distintas técnicas es a veces discordante al analizar variantes no-B (Holguín *et al.*, 2008b).

La diversidad del VIH es el mayor impedimento para el diseño de una vacuna global y eficaz. Dentro del paciente, el rápido escape viral, por medio de sustituciones, inserciones y deleciones de nucleótidos y el uso de escudos de glicano, dificulta la identificación de epítomos que puedan ser objetivo de anticuerpos neutralizantes o de linfocitos T citotóxicos. Además, a nivel poblacional, la cocirculación de múltiples cepas en la misma zona es una dificultad añadida, puesto que el objetivo actual es la creación de vacunas específicas para las variantes circulantes en cada región, dada la imposibilidad de desarrollar inmunidad frente a un amplio rango de variantes (Barouch, 2008; Korber y Gnanakaran, 2009). Los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en zonas concretas cobrarían gran importancia para conocer con detalle y rigurosidad la variabilidad geográfica del virus antes del diseño de dichas vacunas.

Según varios estudios (revisados en Pant Pai *et al.*, 2012) los pacientes infectados por el subtipo D presentan, en ausencia de tratamiento, una progresión acelerada a sida y un mayor deterioro cognitivo que los infectados por otros subtipos. Algunos trabajos incluso apuntan a una tasa de transmisión del virus diferente según el subtipo (Kiwanuka *et al.*, 2009). Por último, la recombinación, fenómeno muy frecuente en el VIH como ya se ha comentado, parece ser también un mecanismo clave en su evolución, confiriendo al virus recombinante ventajas evolutivas y adaptativas frente a los virus parentales (Zhang *et al.*, 2010).

En cuanto a la implicación de la diversidad viral con el tratamiento, ciertas variantes no-B presentan sustituciones específicas en codones relacionados con el desarrollo de resistencias a los ARV (Kantor y Katzenstein, 2003) que pueden alterar la aparición de mutaciones de resistencia en esas posiciones o en otras

adyacentes, bien acelerando su emergencia (Brenner *et al.*, 2006) o bien induciendo vías alternativas de aparición (Grossman *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2008). Se han descrito casos en los que ciertas variantes no-B necesitan acumular menos cambios nucleotídicos en las regiones codificantes de PR, TI e integrasa que el subtipo B para desarrollar una mutación de resistencia debido a los diferentes codones que presentan estas variantes (Martinez-Cajas *et al.*, 2008). También se ha demostrado que polimorfismos naturales muy comunes en la PR de variantes no-B pueden mejorar la capacidad replicativa viral *in vitro* (Holguín *et al.*, 2006b).

Además, existen polimorfismos que pueden reducir la barrera genética (número de mutaciones que el virus necesita acumular para desarrollar resistencia) de algunos fármacos IP (Van de Vijver *et al.*, 2005) y afectar a la afinidad de unión entre fármaco y sustrato (Kinomoto *et al.*, 2005). A pesar de todo esto, la potente terapia antirretroviral combinada disponible en los países desarrollados parece obtener buena respuesta virológica e inmunológica en todos los subtipos (Holguín *et al.*, 2006a; Geretti *et al.*, 2009). No obstante, es en las zonas donde las variantes no-B del VIH-1 son mayoritarias donde no siempre se dispone de los regímenes más potentes del TARGA o éstos no son dispensados de forma universal y continua, lo que dificulta el éxito terapéutico. Por ello, se necesita continuar el estudio de la eficacia de los ARV con un mayor número de pacientes infectados por cada variante, comenzando por las más frecuentes.

Por último, la variabilidad entre las distintas cepas del virus dificulta el rendimiento de diversas herramientas informáticas de amplia utilización y uso durante la monitorización de la infección por VIH por estar basadas en el subtipo B. Ejemplos de estas herramientas son los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica y las herramientas automatizadas de subtipaje del virus, aspectos que se explican más en detalle en el **Capítulo 4** de esta Tesis.

Por todo lo anterior, la adecuada detección y descripción de las variantes del VIH-1 en cohortes representativas es esencial. Para una correcta clasificación de estas variantes del VIH-1 el análisis filogenético es el único método totalmente fiable, puesto que es la herramienta mediante la cual se definieron los distintos linajes del VIH y se determinan las nuevas variantes a medida que se descubren.

OBJETIVOS |

Los objetivos de esta Tesis fueron:

1. Analizar las diferencias epidemiológicas y clínicas así como la diversidad viral en pacientes infectados por VIH diagnosticados en Madrid según su lugar de nacimiento, especialmente en los procedentes del África subsahariana. Evaluar la eficacia del tratamiento antirretroviral en estos pacientes tras un año de seguimiento.
2. Determinar los cambios en la tasa de mutaciones de resistencia transmitidas en los últimos 15 años entre pacientes VIH positivos considerando su origen y otras características epidemiológicas.
3. Describir las posibles cadenas de transmisión del VIH en población autóctona e inmigrante residente en Madrid mediante el uso de análisis filogenéticos de secuencias *pol* del virus.
4. Evaluar la influencia de la introducción de variantes no-B del VIH-1 en la utilidad de distintas aplicaciones informáticas ampliamente utilizadas por personal clínico, como son los algoritmos de interpretación de resistencia genotípica y las herramientas automatizadas de subtipaje.

CAPÍTULO 1

Diferencias clínicas y diversidad viral entre nuevos diagnósticos de VIH-1 africanos y no africanos

ANTECEDENTES

La población inmigrante empadronada en la Comunidad de Madrid representaba en 2010 el 16,7% de la población: 7,2% provenían de Latinoamérica, 6,1% de otros países de la UE, 1,7% eran africanos y el resto de otras regiones (INE, 2011). En la población infectada por VIH, estos porcentajes son aún mayores, puesto que en 2009 las personas inmigrantes supusieron el 47% de los nuevos diagnósticos en esta Comunidad (Díez *et al.*, 2011): 32% latinoamericanos, 7% africanos subsaharianos y 8% de otras regiones. Con frecuencia, los inmigrantes se enfrentan a graves obstáculos para recibir atención médica debido a barreras lingüísticas o culturales y dificultades económicas y sociales. Esto representa un desafío para la mayoría de los profesionales sanitarios, que no están familiarizados con enfermedades que son raras en los países occidentales, lo que puede retrasar el diagnóstico de estas patologías o incluso evitar que se diagnostiquen.

Estos problemas son especialmente acusados para la población procedente de África subsahariana, que sufre el 68% de los casos mundiales de infección por VIH (ONUSIDA, 2011). En esta región los subtipos no-B y los recombinantes del VIH-1 son las variantes más frecuentes (Hemelaar *et al.*, 2011). Además del VIH, en esta población son endémicas infecciones como la tuberculosis y otros patógenos específicos de los Trópicos. La población africana infectada por VIH que vive en países occidentales ha sido objeto de estudio por las mencionadas particularidades socio-culturales. Algunos trabajos han evaluado la eficacia del tratamiento ARV en estos pacientes comparándolos con población autóctona infectada por el VIH en función de su procedencia, raza o del subtipo del virus. Estos son factores íntimamente relacionados entre sí y por tanto difíciles de analizar por separado. Aunque la mayoría de estos estudios no ha encontrado diferencias, un trabajo en EE. UU. obtuvo una peor respuesta al tratamiento (expresada en probabilidad de alcanzar CV plasmática indetectable) en pacientes de raza negra frente a caucasianos (Weintrob *et al.*, 2009). Diferentes estudios han comparado la población según el subtipo viral, lo que habitualmente incluye a los pacientes subsaharianos entre los infectados por formas no-B. Pese a que ninguno encontró diferencias, algunos de ellos señalan que las características socio-culturales son

más importantes que las étnicas, biológicas o genéticas de virus y/o paciente (de Arellano *et al.*, 2007; Geretti *et al.*, 2009; Bouchaud *et al.*, 2011).

En este primer capítulo se analizan las características clínicas y epidemiológicas y la naturaleza genética de las variantes del VIH-1 en una cohorte de pacientes subsaharianos diagnosticados de VIH-1 durante un período de 3 años (2005-2007) en la consulta de Enfermedades Tropicales del Hospital Carlos III de Madrid. Se incluyó un grupo control, formado por todos los pacientes infectados por VIH-1 no africanos diagnosticados en ese periodo de tiempo en dicha consulta. El objetivo fue comparar de ambas poblaciones y así resaltar sus diferencias. Además, se evaluó la respuesta al tratamiento ARV de estos pacientes tras un año de terapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Los pacientes fueron seguidos en el Hospital Carlos III de Madrid. Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico serológico positivo de VIH-1 mayores de 18 años que acudieron a la consulta de Enfermedades Tropicales desde enero de 2005 hasta diciembre de 2007. Se registraron los datos demográficos, clínicos y de laboratorio según los informes médicos. Los diagnósticos se realizaron en el Servicio de Microbiología del Hospital Carlos III. Se definió la “eosinofilia total” (marcador asociado a la infección por helmintos) como un recuento mayor de 0,7 eosinófilos/ μ l, y “eosinofilia relativa” cuando ese recuento fue menor de 0,7 eosinófilos/ μ l pero superior al 7%. La IgE se consideró elevada cuando superó las 200 UI/ml. Los pacientes diagnosticados con VIH-1 en 2005 y 2006 que iniciaron TARGA fueron analizados retrospectivamente. Los recuentos de linfocitos CD4+ (mediante citometría de flujo [Coulter, Barcelona]) y los valores de CV (mediante VERSANT HIV-1 RNA bDNA v3.0 [Siemens, Barcelona]) se evaluaron en la muestra basal y después de un año tras el inicio del TARGA.

Diagnóstico serológico de VIH-1 y hepatitis

Para la detección de anticuerpos frente a VIH-1 y VIH-2 se utilizaron dos ELISA comerciales diseñados con péptidos sintéticos o proteínas recombinantes (AxSYM, Abbott Diagnostics, Chicago, EE. UU. y BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, Francia). Las muestras reactivas fueron confirmadas mediante un *western blot* de lisado viral

VIH-1 (New LAV BLOT I, BIO-RAD) y un inmunoensayo capaz de distinguir entre anticuerpos frente a VIH-1 y VIH-2 (Pepti-LAV, BIO-RAD). Se consideró la infección por VIH-1 como reciente si había ocurrido 12 meses antes del diagnóstico. El diagnóstico de hepatitis B y C se realizó mediante pruebas serológicas (Architect, Abbott Diagnostics).

Diagnóstico de otras enfermedades infecciosas

Todos los pacientes africanos fueron examinados en busca de infecciones endémicas de sus regiones de origen. Para serología de microfilarias, filarias, *Schistosoma* y la tripanosomiasis africana se empleó microscopía de deposiciones, sangre y muestras de piel. En el caso de eosinofilia total o relativa y/o IgE elevada sin diagnóstico tras el primer examen, se realizaron serologías de *Strongyloides*, *Toxocara*, *Equinococcus* y *Fasciola*, así como IgE específica de *Ascaris lumbricoides*. El estudio de la malaria incluyó tanto extensión de gota gruesa como amplificación de ADN de *Plasmodium* mediante PCR semianidada (*semi-nested*).

Amplificación y secuenciación de genes del VIH-1

Las alícuotas de plasma fueron separadas de las células sanguíneas en las 4 horas posteriores a su extracción, y congeladas a -80°C hasta el momento del análisis. A partir de ellas se llevó a cabo la extracción de ARN viral (QIAamp viral RNA mini extraction kit, Qiagen, Hilden, Alemania), secuenciación directa y análisis filogenético de las secuencias. Éstas se obtuvieron desde los productos purificados de PCR anidada (*nested*) de las regiones codificantes de *gag*, *pol* y *env* (*gp41*) del VIH-1 en el grupo de africanos, y sólo de *pol* en los no africanos. En algunos casos, *gag* y *pol* fueron amplificados en un solo amplicón (2557pb, posiciones 693-3250 en la secuencia de referencia HXB2) con los cebadores externos 506D y NEI35, y los internos 693D y RT4m. Las condiciones fueron: incubación a 94°C durante 3m, 35 ciclos a 94°C durante 30s, 52°C durante 30s y 72°C durante 2m30s, con una extensión final a 72°C, 10m. Los cebadores usados en la secuenciación de *gag-pol* fueron 693D, 1309D, 1333R, RT4m y Prot4. Cuando *gag* y *pol* fueron analizados por separado, *gag* fue amplificado parcialmente (515pb, posiciones 1754-2269 en HXB2) utilizando los cebadores externos Cliv1 y Cliv2 y los internos ClivN1, y ClivN2. Por su parte, las secuencias *pol*, de las que parte ya se habían publicado (Holguín *et al.*, 2008a), incluían en todos los casos la región codificante de la PR

completa (297pb) y parte de la TI (codones 1-247 en los casos en que se usó Trugene [Siemens, Barcelona] o codones 1-335 cuando se usó Viroseq HIV-1 Genotyping System [Celera Diagnostic, La Alameda, EE. UU.]). La secuenciación de *pol* se realizó usando los cebadores Prot3, RT4m y A35. La región codificante de *gp41* completa (1036pb, posiciones 7759-8795 en HXB2) se amplificó usando los cebadores externos 7655D y 9064R, y los internos 7662D y 8992R. Las condiciones fueron: incubación a 94°C durante 2m, 35 ciclos a 94°C durante 40s, 43°C durante 40s y 72°C durante 2m, con una extensión final a 72°C, 10m. Para la PCR anidada, se utilizaron las mismas condiciones con la hibridación de los cebadores a 40°C. Los cebadores usados en la secuenciación de *gp41* fueron 7662D, 8992R, 8275D y 43ED (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR.

Cebador	Posición ¹	Uso ²	Secuencia (5'-3')
Ida			
506D	506-534	P	GGA ACC CAC TGC TTA AGC CTC AAT AAA G
693D	693-719	P, S	CTC TCG ACG CAG GAC TCG GCT TGC TG
1309D	1309-1334	S	GCA TTA TCA GAA GGA GCC ACC CCA C
Prot3	2136-2164	S	TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A
7655D	7655-7679	P, S	CAA TTG GAG AAG TGA AYT ATA TAA
7662D	7662-7688	P, S	GAG AAG TGA AYT ATA TAA RTA TAA AG
8275D	8275-8297	S	TAT TYA TAA TGA TAG TAG GAG G
Cliv1	1739-1759	P	GAC AGA AAC CTT GTT GGT CC
ClivN1	1754-1772	P	TGG TCC AAA ATG CGA ACC
Vuelta			
NEI35	3299-3334	P	CTT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT
RT4m	3230-3257	P, S	AGG ATG GAG YTC ATA YCC CAT CCA AAG
1333R	1308-1333	S	GTG GGG TGG CTC CTT CTG ATA ATG C
Prot4	2620-2650	S	AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC
A35	2538-2573	S	TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT
9064R	9044-9064	P, S	CCC CCC TTT TCT TTT AAA AA
8992R	8969-8992	P, S	TGA GGY CTG ACT GGA AAR CCY AC
43ED	8371-8401	S	GCG ACT AGT GAG TAT CCC TGC CTA ACT CTA
Cliv2	2256-2275	P	CGC TGC CAA AGA GTG ATC T
ClivN2	2249-2269	P	AAA GAG TGA TCT GAG GGA AG

¹ Posición en el genoma VIH-1 de acuerdo con la secuencia de referencia HXB2 (número de acceso K03455). ² Uso del cebador: P, cebador utilizado en la amplificación por PCR; S, cebador utilizado en secuenciación.

Subtipaje del VIH-1

Los subtipos o recombinantes del VIH-1 se caracterizaron mediante análisis filogenético de las secuencias *gag*, *pol* y *env* (*gp41*) recopiladas previamente en el laboratorio. Se incluyeron como referencias al menos 2 secuencias representativas de cada uno de los 9 subtipos y los 42 CRF descritos en el momento del análisis, que fueron descargadas de la base de datos del Laboratorio Nacional de Los Álamos de EE. UU. (**Anexo I**). Se tomó como raíz la secuencia YBF30, perteneciente al grupo N del VIH-1. Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalX versión 2.0.11 (**Anexo I**). La topología del árbol filogenético se obtuvo mediante el método de unión por vecindad (*neighbour-joining*), calculando la matriz de distancias con el modelo de sustitución nucleotídica de dos parámetros de Kimura, usando el paquete informático PHYLIP (**Anexo I**). Para comprobar la robustez estadística del árbol, se aplicó un remuestreo tipo *bootstrap* con 1.000 repeticiones. Sólo se consideró fiable la caracterización de cada variante cuando el valor del *bootstrap* fue superior a 700. Se consideraron como “subtipos puros” aquellas secuencias con el mismo subtipo en todas las regiones analizadas. Las variantes consideradas “recombinantes” fueron aquellas con diferentes subtipos o formas recombinantes en las distintas regiones (consideradas como URF), o con la misma forma recombinante en todas las regiones (consideradas como CRF).

Análisis estadísticos

Las diferencias entre variables categóricas fueron analizadas utilizando la prueba de chi cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. Se consideró la significación estadística con valores de *P* menores a 0,05. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

RESULTADOS

Datos demográficos, clínicos e inmunológicos

Se identificaron 278 nuevos diagnósticos de VIH-1 entre 2005 y 2007, de los que 188 (67,6%) eran no africanos y 90 (32,4%) africanos subsaharianos. Estos últimos procedían de 8 países diferentes: Guinea Ecuatorial (*n*=75 pacientes; 83,3%), Nigeria (*n*=7; 7,8%), República Democrática del Congo, Kenia (cada uno, *n*=2; 2,2%), Camerún, Costa de Marfil, Guinea-Bissau y Mali (cada uno, *n*=1; 1,1%).

Entre los pacientes no africanos (grupo control), 129 eran europeos (116 españoles, 5 de Portugal, 2 de Francia, 2 de Inglaterra y 4 de otros países) y 59 latinoamericanos (15 de Ecuador, 13 de Brasil, 7 de Perú, 4 de Cuba, 3 de Argentina, Chile y Colombia, 2 de Bolivia, México y Paraguay y 5 de otros países). La **Tabla 1.2** muestra los principales datos demográficos y clínicos de todos los pacientes según su origen.

Tabla 1.2: Datos clínicos y demográficos de los nuevos diagnósticos VIH según su origen.

Características	Africanos subsaharianos	Grupo Control		P
		Latino- americanos	Europeos	
Nº de pacientes	90	59	129	-
Edad (años) ¹	41 (31,5-49,5)	34 (27-37)	38 (32-45)	<0,001
Hombres (%)	42,2	86,4	89,1	<0,001
Categoría de exposición (%)				
Homosexual	1,1	75,4	64,7	<0,001
ADVP	1,1	0	9,2	0,004
Heterosexual	89,9	22,8	24,4	<0,001
Otras/desconocida	7,9	1,8	1,7	0,025
Recuento CD4 (cél/μl) ¹	270 (146-434)	266 (171-459)	375 (220-601)	0,014
Porcentaje de CD4 ¹	13 (9-22)	14 (9-21)	20 (13,5-30)	<0,001
Pacientes con <200 CD4/μl (%)	37	32,7	23,2	0,087
Pacientes con <50 CD4/μl (%)	9,9	12,7	8,8	0,74
Infección VIH reciente (%)	4	13,2	20,5	0,002
Carga Viral (log copias/ml) ¹	4,5 (3,8-4,9)	4,6 (4,1-5,1)	4,4 (3,9-5,0)	0,39
Estadio CDC (%)				
A	54,5	70,9	79	<0,001
B	17	12,7	10,5	0,16
C	28,4	16,4	10,5	0,001
Ag VHB -positivos (%)	5,6	3,4	4,7	0,79
Ac VHC -positivos (%)	11,1	0	10,9	0,003
Tuberculosis (%)	18,2	8,6	2,3	<0,001
Otras infecciones bacterianas (%)	23,8	9,1	7,2	0,001
ITS (%)	10,7	21,4	14,5	0,21
Sífilis (%)	7,1	14,5	12,2	0,34
Infección protozoaria/helmíntica (%)	51,1	7	4,2	<0,001

¹ Expresado en mediana (rango intercuartílico). El valor P corresponde a la comparación de mediante chi cuadrado de las proporciones en el grupo de africanos frente al control.

Los africanos y los europeos mostraron una edad similar, que fue significativamente superior a la de los latinoamericanos. Comparados con el resto, los africanos tenían mayor representación femenina (58% y 12%; $P<0,001$), una mayor tasa de infección por contacto heterosexual (90% y 24%; $P<0,001$) y presentaban un estadio clínico CDC más avanzado. El 9,3% de las mujeres africanas en edad fértil estaban embarazadas. La representación de cada sexo, el estadio CDC, la CV basal o las comorbilidades no difirieron entre europeos y latinoamericanos.

Los europeos tenían un mejor estado inmunológico tanto por recuento de CD4+ (375 céls CD4+/ μ l) como por porcentaje de CD4+ en el total de linfocitos (20%) comparados con africanos (270 céls/ μ l y 13%; $P<0,05$ en ambas comparaciones) y latinoamericanos (266 céls/ μ l y 14%; $P<0,05$). El porcentaje de africanos con menos de 200 células CD4+/ μ l en la primera visita fue similar al de no africanos (37% y 32%). Esta tasa solo fue menor en los europeos (23%; $P=0,04$), incluso con cargas virales similares. La mayor proporción de infecciones por VIH-1 recientes se encontró en europeos (20,5%) y la menor en africanos (4%). Además, la enfermedad definitoria de sida más frecuente fue la tuberculosis, afectando al 64% de los diagnosticados de sida africanos y al 27% de no africanos ($P=0,008$). Otras enfermedades definitorias de sida encontradas en los 90 pacientes africanos fueron: sarcoma de Kaposi ($n=4$ pacientes), citomegalovirus ($n=3$), neumonía por *Pneumocystis jiroveci* ($n=2$), candidiasis esofágica ($n=2$), toxoplasmosis cerebral ($n=2$), leucoencefalopatía multifocal progresiva ($n=1$) y síndrome *wasting* ($n=1$).

Infecciones concomitantes en el momento del diagnóstico de VIH-1

La prevalencia de coinfecciones de VIH-1 con el virus de la hepatitis B fue similar entre los grupos (**Tabla 1.2**). Sin embargo, no hubo coinfecciones con hepatitis C entre los 59 latinoamericanos, probablemente debido a la ausencia de ADVP entre ellos. La tasa de pacientes africanos y europeos con infecciones de transmisión sexual (ITS) fue similar, siendo éstas más frecuentes entre los latinoamericanos. Una mayor proporción de pacientes africanos presentaron infecciones bacterianas, incluyendo infecciones del tracto urinario ($n=7$ pacientes), neumonía bacteriana ($n=4$), infecciones del tracto respiratorio superior ($n=3$),

gastroenteritis bacteriana ($n=2$), abscesos profundos ($n=2$), colangitis aguda ($n=1$) y colecistitis aguda ($n=1$).

Todos los pacientes (africanos y no africanos) con sospecha de infección por protozoos y/o helmintos fueron examinados. La eosinofilia total y la IgE elevada fueron comunes entre los africanos (17% y 58%, respectivamente), presentando el 29% de ellos eosinofilia relativa. Las infecciones parasitarias fueron más frecuentes en los africanos (51%) que en los no africanos (5%) examinados en busca de parásitos (**Tabla 1.3**). Los africanos parasitados mostraron una mediana de CD4+ menor que los no parasitados (238 y 303 céls/ μ l; $P=0,028$). El recuento de CD4+ resultó inversamente proporcional al número de infecciones parasitarias ($r=-0,32$; $P=0,005$) y directamente proporcional al número total de eosinófilos ($r=0,36$; $P=0,001$). La eosinofilia total, la eosinofilia relativa y el título de IgE fueron significativamente mayores en los pacientes africanos con infección helmíntica ($P=0,001$, $P=0,049$ y $P=0,009$, respectivamente), pero sólo en los pacientes inmunocompetentes, es decir, con más de 200 céls CD4+/ μ l.

Tabla 1.3: Infecciones parasitarias en pacientes subsaharianos VIH-1 positivos.

Diagnósticos ¹	Nº	%
Protozoos		
Malaria	13	14,4
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4	4,4
<i>Giardia lamblia</i>	4	4,4
<i>Trypanosoma brucei</i>	1	1,1
Helmintos		
<i>Schistosoma</i> sp.	3	3,3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	11	12,2
<i>Trichuris trichiura</i>	7	7,7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3	3,3
Uncinarias	1	1,1
<i>Toxocara</i> sp.	1	1,1
<i>Taenia solium</i> /cisticercosis	1	1,1
<i>Mansonella perstans</i>	5	5,5
<i>Oncocerca volvulus</i>	3	3,3
<i>Loa loa</i>	2	2,2
Cualquier infección parasitaria	46	51,1

¹ El 69% de los africanos parasitados presentó un patógeno, el 26% dos y el 5% tres o más.

Se diagnosticó la malaria en 13 africanos (14,4%), 12 de ellos infectados por *Plasmodium falciparum* y uno por *P. malariae*. Presentaron una viremia VIH-1 significativamente mayor (4,9 y 4,2 log copias ARN-VIH/ml; $P=0,037$) y recuento de CD4+ menor (245 y 285; $P=0,1$) que aquellos sin malaria. En 6 pacientes asintomáticos o solo con síntomas leves inespecíficos, el diagnóstico de malaria se realizó mediante PCR positiva teniendo un ensayo previo de gota gruesa negativo.

Respuesta al TARGA en pacientes africanos frente a no africanos

En la primera visita, un mayor número de africanos que de no africanos presentaron criterios para comenzar el TARGA (72% y 56%; $P=0,024$). En 2005 o 2006, 61 no africanos y 29 africanos comenzaron el tratamiento. En los africanos, el TARGA pautado incluía 2 ITIAN + 1 IP en el 60,7% de los casos y 2 ITIAN + 1 ITINAN en el 39,3%. Los no africanos recibieron 2 ITIAN + 1 ITINAN en el 48,9% de casos, 2 ITIAN + 1 IP en el 46,7% y otras pautas en el 4,4%. En todos los grupos, los ARV más usados fueron emtricitabina+tenofovir como combinación de ITIAN, lopinavir/ritonavir como IP y efavirenz como ITINAN.

Tras un año de seguimiento después del inicio del TARGA, una proporción significativamente menor de africanos que de no africanos (41,4% y 82%; $P<0,001$) consiguió mantener la CV por debajo del límite de detección (50 copias ARN- VIH/ml). Se observó una mediana del aumento en el número de CD4+ similar en los africanos y no africanos que alcanzaron la CV indetectable tras el año de tratamiento (251 y 215 céls/ μ l; $P=0,20$). Los africanos presentaron una proporción significativamente mayor de pérdidas de seguimiento que los no africanos (41,4% y 11,5%; $P<0,001$), pero ambos grupos mostraron tasas similares de fallos virológicos (18,5% y 6,6%; $P=0,11$). En 4 de los 5 casos de fallo virológico en africanos éste se asoció a una falta transitoria de medicación antirretroviral durante visitas cortas a sus países de origen.

Variantes del VIH-1 en los nuevos diagnósticos

La **Tabla 1.4** muestra el número y porcentaje de pacientes infectados por los distintos subtipos y recombinantes del VIH-1 en nuestra población de estudio. El subtipaje del VIH-1 se pudo realizar en alguna región genética del virus en el 73% de los casos en africanos y en el 66,5% de no africanos. El resto no pudo ser

determinado por fallos en la amplificación por PCR, probablemente debidos a la heterogeneidad genética, la falta de muestra de plasma o una CV insuficiente.

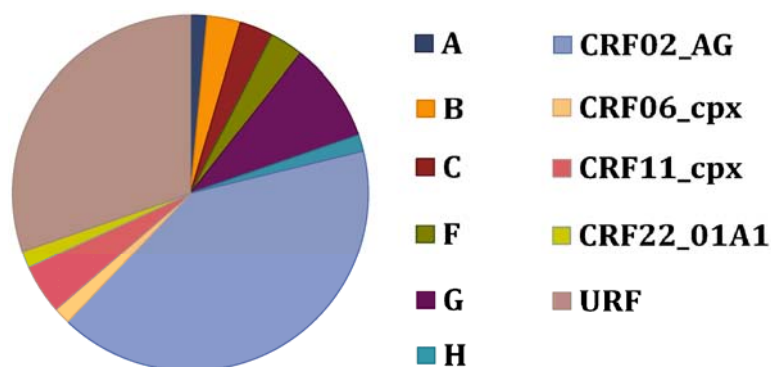
Tabla 1.4: Variantes del VIH-1 entre los nuevos diagnósticos con subtipo disponible según su origen.

Variante del VIH-1	% de pacientes subtipados			P
	Africanos subsaharianos (n=66)	Grupo control (n=125)		
		Latinoamericanos (n=39)	Europeos (n=86)	
Subtipo B	3 (2/66)	92,3 (36/39)	90,7 (78/86)	<0,001
Formas no-B	97 (64/66)	7,7 (3/39)	9,3 (8/86)	<0,001
Subtipos no-B “puros”	18,2 (12/66)	0 (0/39)	4,6 (4/86)	<0,001
Recombinantes	78,8 (52/66)	8 (3/39)	4,6 (4/86)	<0,001
CRF	61,5 (32/52)	100 (3/3)	75 (3/4)	0,21
URF	38,5 (20/52)	0 (0/3)	25 (1/4)	0,21

El valor *P* corresponde a la comparación de proporciones en el grupo de africanos frente al control mediante la prueba de chi cuadrado.

La naturaleza de los virus que infectaban a los africanos se muestra en la **Figura 1.1** y más en detalle para cada región genética en la **Tabla 1.5**. La tasa de subtipos no-B y recombinantes del VIH-1 en el grupo de africanos fue extremadamente alta comparada con el grupo control (97% y 8,8%; $P<0,001$). Entre las cepas encontradas en africanos, los recombinantes CRF02_AG fueron los más frecuentes, y los URF causaron cerca del 40% de las infecciones por virus recombinantes.

Figura 1.1: Variantes del VIH-1 que infectan al grupo de subsaharianos.



Considerando las tres regiones (*gag*, *pol* y *env* [*gp41*]), el 79% de los africanos estaban infectados por variantes del VIH-1 que incluían secuencias recombinantes. En cambio, en los no africanos sólo se encontró un 5,6% de recombinantes en *pol*.

Los subtipos no-B “puros”, con el mismo subtipo no-B en todas las regiones analizadas, se encontraron en el 18,2% de los africanos y el 3,2% de los no africanos. Entre los no africanos, el subtipo B fue la variante más frecuente (91,2%). Solo 11 no africanos (2 de ellos españoles) estaban infectados por virus no-B en *pol* (1 A, 1 C, 2 G, 1 CRF01_AE, 1 CRF02_AG, 1 CRF10_CD, 2 CRF12_BF y 2 CRF31_BC), siendo pacientes procedentes de zonas donde circulan esas variantes o con contactos de riesgo con personas de esas áreas. Posteriores análisis en *gag* y *gp41* revelaron la naturaleza compleja del CRF10_CD aislado de una mujer española, infectada por su pareja keniana (paciente 14 en la **Tabla 1.5** y mostrado en la **Figura 1.2**), por lo que se redefinió como URF: U^{*gag*}/CRF10_CD^{*pol*}/A^{*gp41*}.

Tabla 1.5: Caracterización de las variantes del VIH-1 en los pacientes africanos.

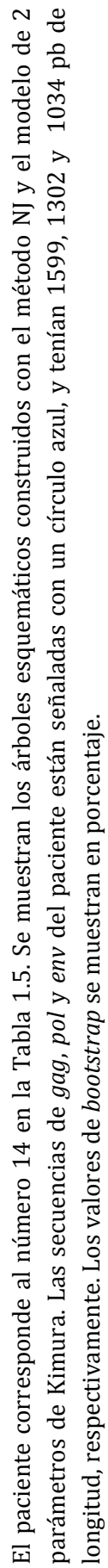
Paciente	País de origen	Variante del VIH-1		
		<i>gag</i>	<i>pol</i> (PR/RT)	<i>gp41</i>
1	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	URF(A)
2	Guinea Ecuatorial	C	C	C
3	Guinea Ecuatorial	A	A	URF(A)
4	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
5	Guinea Ecuatorial	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx
6	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
7	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
8	Guinea Ecuatorial	F2	F2	F2
9	Guinea Ecuatorial	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx
10	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
11	Guinea Ecuatorial	–	H	–
12	Guinea Ecuatorial	A	CRF01_AE	A
13	Nigeria	G	G	G
14	Kenia	U	CRF10_CD	A
15	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
16	Guinea Ecuatorial	C	C	C
17	Guinea Ecuatorial	–	CRF10_CD	D
18	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
19	Guinea Ecuatorial	–	–	CRF02_AG
20	Guinea Ecuatorial	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx
21	Guinea Ecuatorial	–	–	B
22	Guinea Ecuatorial	U	C	CRF02_AG
23	Guinea Ecuatorial	CRF22_01A1	CRF22_01A1	CRF22_01A1
24	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	CRF02_AG
25	Nigeria	–	G	CRF14_BG
26	Guinea Ecuatorial	–	CRF11_cpx	U

(continúa)

Tabla 1.5 (continuación)

Paciente	País de origen	Variante del VIH-1		
		<i>gag</i>	<i>pol</i> (PR/RT)	<i>gp41</i>
27	Guinea Ecuatorial	CRF06_cpx	CRF06_cpx	CRF02_AG
28	Guinea Ecuatorial	–	C	U
29	Guinea Ecuatorial	–	A	U
30	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	CRF02_AG
31	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
32	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
33	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
34	Guinea Ecuatorial	–	U	U
35	Guinea Ecuatorial	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG
36	Guinea Ecuatorial	–	CRF11_cpx	U
37	Guinea Ecuatorial	A	–	U
38	R. D. Congo	–	CRF11_cpx	U
39	Guinea Ecuatorial	–	G	–
40	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
41	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
42	Nigeria	–	CRF02_AG	–
43	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
44	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
45	Guinea Ecuatorial	–	URF(D)	–
46	Guinea Ecuatorial	–	URF(02/06)	–
47	Guinea Ecuatorial	–	URF(A/01)	–
48	Guinea Ecuatorial	–	URF(02/06)	–
49	Costa de Marfil	–	CRF02_AG	–
50	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
51	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
52	Guinea Ecuatorial	–	F2	–
53	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
54	Guinea Ecuatorial	–	G	–
55	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
56	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
57	Camerún	–	CRF02_AG	–
58	Guinea Ecuatorial	–	G	–
59	Guinea Ecuatorial	–	A	–
60	Guinea Ecuatorial	–	G	–
61	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
62	Guinea Ecuatorial	–	URF(G/02)	–
63	Guinea-Bissau	–	B	–
64	Guinea Ecuatorial	–	CRF02_AG	–
65	Nigeria	–	CRF06_cpx	–
66	Nigeria	–	G	–

El guión indica fallo en la amplificación de la muestra o ausencia de ésta. U, secuencias que no pudieron ser asignadas a ninguna variante concreta.



DISCUSIÓN

En este capítulo se comparan las características clínico-epidemiológicas y las variantes del VIH-1 en una gran cohorte de nuevos diagnósticos infectados por VIH africanos frente a no africanos, durante un periodo de 3 años. El número de inmigrantes que llegan a España ha aumentado significativamente en los últimos 15 años, por lo que sus características clínicas son de gran interés y merecen una atención especial. Los individuos VIH positivos procedentes de países en desarrollo pueden presentar infecciones inusuales en los países desarrollados, complicando así su asistencia clínica.

Como se confirma en el grupo de no africanos, el subtipo B sigue siendo la variante del VIH-1 prevalente en los países desarrollados, incluyendo España. Sin embargo, se han introducido nuevas cepas que están cambiando la epidemiología molecular del VIH-1 en los países de acogida. En Europa se ha descrito entre los nuevos diagnósticos de VIH-1, tanto nativos como inmigrantes, una prevalencia de variantes no-B creciente y relativamente alta (desde el 15% al 50% según los países). En España, una de las vías de llegada de africanos a Europa, las formas no-B y recombinantes suponen ya el 10-15% de las infecciones por VIH-1, aunque esta proporción está en aumento (Holguín *et al.*, 2008a). En este estudio, se encontraron recombinantes en el 79% de las 75 nuevas infecciones por no-B en 2005-2007, lo que indica la gran variabilidad en las cepas de VIH-1 importadas.

Como se ha comentado en la introducción a esta Tesis, la identificación de subtipos no-B y recombinantes del VIH-1, más allá de la mera descripción epidemiológica, puede influir en la respuesta clínica. Sin embargo, en este estudio tanto la respuesta virológica como inmunológica al TARGA fue similar en todos los grupos tras un año de tratamiento, como se ha descrito en la mayoría de publicaciones anteriores (de Arellano *et al.*, 2007; Geretti *et al.*, 2009; Bouchaud *et al.*, 2011). Para valorar este tipo de aspectos se necesitan estudios a largo plazo en cohortes mayores infectadas por distintas variantes, para así buscar diferencias en la respuesta a ARV concretos para cada variante. Sin embargo, sí que hubo diferencias en cuanto al nivel de interrupciones del tratamiento por una mayor presencia de pérdidas de seguimiento en el grupo de subsaharianos, el mismo

resultado obtenido por otra cohorte española, posiblemente por la movilidad geográfica de esta población en busca de empleo (Pérez Molina *et al.*, 2010).

Al contrario que en la epidemia general en Europa, las mujeres fueron mayoría entre los nuevos diagnósticos de VIH africanos, al igual que ocurre en África, donde alrededor del 60% de los adultos infectados son mujeres (ONUSIDA, 2011). Además, un número importante de ellas fueron diagnosticadas de VIH-1 durante el embarazo, como ocurre en otras cohortes (Llenas-García *et al.*, 2012), remarcando la importancia de las pruebas de VIH prenatales para reducir su transmisión vertical. Por su parte, el contagio por prácticas homosexuales fue muy inusual entre los africanos en comparación con el resto. Según los resultados, se deduce que los subsaharianos presentaban un mayor tiempo de infección, seguidos por los latinoamericanos y, finalmente, los europeos. Por lo tanto, resulta fundamental que se inicien programas de educación sanitaria en los países en desarrollo, así como entre las comunidades de inmigrantes que residen en países desarrollados, con el fin de aumentar el conocimiento acerca de la infección por VIH y los recursos terapéuticos existentes. Así se reduciría también el estigma asociado con el VIH o la falta de percepción de los riesgos de la enfermedad.

La tuberculosis, primera causa mundial de muerte entre los infectados por VIH (ONUSIDA, 2011), fue la infección oportunista más frecuente en el grupo de inmigrantes africanos de este estudio. También fueron muy frecuentes entre ellos las infecciones por helmintos y protozoos, sobre todo en aquellos con inmunodepresión más severa. Otras infecciones asintomáticas pero relevantes encontradas entre los subsaharianos infectados por el VIH fueron filariasis, estrongiloidiasis o esquistosomiasis. Estos datos apoyan la necesidad de evaluar las infecciones parasitarias en los inmigrantes africanos VIH positivos, incluso cuando no presenten eosinofilia. Además, reafirman la necesidad de aumentar el conocimiento del personal clínico sobre la posible presencia de estos parásitos en esta población. La malaria es, junto con el VIH y la tuberculosis, el patógeno más importante que actualmente devasta las zonas tropicales. Se han encontrado complejas interacciones bidireccionales entre el *Plasmodium falciparum* y el VIH (Herrero *et al.*, 2007). La malaria se asocia con una mayor carga viral de VIH transitoria y con menores recuentos de linfocitos CD4+, y podría aumentar la

replicación del VIH, acelerando el curso de la enfermedad. Por el contrario, la infección por VIH parece aumentar sólo ligeramente el riesgo de parasitemia y manifestación sintomática de la malaria en adultos semi-inmunes en regiones de transmisión estable e importante. Entre los africanos estudiados se encontró una alta tasa de malaria asintomática sólo detectable por técnicas moleculares, dado que la mayoría de ellos procedían de regiones de África occidental con transmisión estable de malaria. La inmunidad adquirida resulta esencial en la eliminación de parásitos, por lo que la inmunosupresión severa podría facilitar la persistencia de la malaria. Dado que ésta es común entre los inmigrantes africanos infectados por el VIH, se necesitan esfuerzos para su diagnóstico y tratamiento, particularmente en los pacientes más gravemente inmunodeprimidos.

La mayoría de los pacientes africanos infectados por VIH incluidos procedían de África central y occidental, con escasa representación de pacientes infectados en otras zonas, lo que podría suponer cierto sesgo de los resultados. Atendiendo a la diversidad del VIH-1, el estudio sería más exacto si los virus aislados a partir de los pacientes no africanos fueran analizados en un mayor número de regiones. Esto sería de utilidad para detectar la heterogeneidad que no podemos percibir sólo con análisis de *pol*.

Como resumen, se deduce de este trabajo que el perfil de los inmigrantes subsaharianos infectados por el VIH y residentes en España varía ampliamente comparado con el de los infectados nativos o los inmigrantes más numerosos, aquellos procedentes de América Latina. Los individuos VIH-1 positivos de países de bajos recursos pueden presentar infecciones endémicas raras en los países occidentales, complicando así su manejo clínico. Los extranjeros infectados por el VIH-1 presentaron una infección más avanzada, sobre todo los africanos subsaharianos. Por último, a pesar de que el subtipo B del VIH-1 es la variante más prevalente en España, se están introduciendo nuevas variantes del VIH-1 (subtipos no-B y recombinantes) a través de la inmigración, cambiando la epidemiología molecular del VIH-1 en nuestro país.

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**.

CAPÍTULO 2

**Cambios en la tasa de resistencia
transmitida en población infectada
por el VIH-1 según su origen**

ANTECEDENTES

Como se ha comentado antes, el VIH es capaz de seleccionar mutaciones que le permiten escapar de la acción de cualquiera de los fármacos ARV descritos hasta ahora en respuesta a la exposición a este tratamiento. En muchas ocasiones la adquisición de estas mutaciones confiere al virus un perjuicio a nivel de capacidad replicativa, de forma que si el tratamiento cesara, la variante silvestre del VIH (es decir, sin mutaciones de resistencia) rápidamente volvería a ser mayoritaria. Pero en otros casos, la mutación de resistencia seleccionada no altera esta capacidad, o bien el virus desarrolla otros cambios que compensan estos perjuicios. Es entonces cuando el VIH mantiene estas mutaciones incluso en ausencia de tratamiento, pudiendo ser transmitidas a otro individuo mediante un nuevo contagio.

La presencia de mutaciones de resistencia transmitidas (MRT) en pacientes que nunca han recibido TARGA (pacientes “naive”) es un grave problema para el control de la infección por VIH-1. Varios estudios han descrito un alto riesgo de fracaso virológico a la primera terapia en pacientes infectados por virus portadores de mutaciones que confieren resistencia a alguno de los ART recibidos. Sin embargo, si el primer tratamiento se pauta guiado por un ensayo de resistencias previo se consigue una eficacia similar a la encontrada en pacientes infectados por virus silvestre (Bannister *et al.*, 2008; Wittkop *et al.*, 2011). Por ello, las guías nacionales (GeSIDA, 2012) e internacionales (Hirsch *et al.*, 2008; Vandamme *et al.*, 2011) de tratamiento ARV recomiendan que el tratamiento inicial sea elegido en función de los resultados previos de un ensayo de resistencias del VIH realizado previamente. Numerosos trabajos han analizado la prevalencia de MRT en Europa Occidental, que se sitúa alrededor del 10%, y en Estados Unidos, donde suele ser mayor superando incluso el 20%. En España, según una revisión de 26 trabajos, esta prevalencia está alrededor del 11% (Yebra y Holguín, 2010). Sin embargo, la heterogeneidad metodológica y experimental de los estudios que analizan las MRT hace que las comparaciones, en ocasiones, sean complicadas por su discordancia. En la **Tabla 2.1** se resumen las variables a considerar en los estudios de prevalencia de mutaciones de resistencia y que pueden afectar a la estimación de las MRT.

Tabla 2.1: Variables metodológicas que influyen en los estudios de MRT.

1	Tamaño muestral
2	Periodo de estudio
3	Área geográfica de estudio
4	Población seleccionada: seroconvertidores, infectados crónicos, <i>naïve</i> en general, nuevos diagnósticos, etc.
5	Procedencia de los pacientes: nativos o inmigrantes, lugar de infección, etc.
6	Diferencias metodológicas: <ul style="list-style-type: none">▪ en los métodos de detección de resistencias: LiPA, secuenciación, etc.▪ en las listas de mutaciones de resistencia consideradas▪ en la sensibilidad del método para detectar variantes resistentes en poblaciones minoritarias
7	Subtipo genético o recombinante del VIH-1. Técnica empleada en el subtipaje

LiPA: Ensayo de sondas en línea (*Line Probe Assay*).

A nivel global, tras un periodo de aumento continuo en la tasa de MRT con cierto desfase según los países (Porter *et al.*, 2001; Little *et al.*, 2002; Masquelier *et al.*, 2005), la eficacia del TARGA y el desarrollo de nuevos ARV e incluso nuevas familias de estos fármacos han producido una estabilización en la tasa de MRT (Yerly *et al.*, 2007; Bannister *et al.*, 2008; Chaix *et al.*, 2009; Vercauteren *et al.*, 2009; Bartmeyer *et al.*, 2010) o incluso disminución (de Mendoza *et al.*, 2005; UK Cohort, 2007).

La tasa de está relacionada con el índice de fracaso terapéutico y la consecuente emergencia de resistencias o con los patrones de resistencia en la población pretratada (Blower *et al.*, 2001). De hecho, modelos matemáticos han predicho una asociación significativa entre la tasa de MRT y factores como las guías de tratamiento del país en cuestión y la capacidad replicativa de las cepas portadoras de resistencias. Por lo tanto, la tendencia de la prevalencia de MRT puede estar íntimamente relacionada con los programas de tratamiento antirretroviral establecidos en cada región, aunque sólo unos pocos estudios han desglosado las prevalencias de MRT según el origen de los pacientes (The SPREAD Programme, 2008; Vercauteren *et al.*, 2009). Dado que los inmigrantes suponen una proporción creciente entre la población infectada por VIH en los países desarrollados, la

presencia y tendencias de MRT entre este colectivo debería ser explorada en más detalle. En España, un tercio de los pacientes con nuevos diagnósticos por VIH son inmigrantes (Caro-Murillo *et al.*, 2009; Díez *et al.*, 2011; SINIVIH, 2011), la mayoría de ellos procedente de Latinoamérica y África subsahariana. Las características socio-culturales especiales de estas poblaciones, así como las políticas de tratamiento antirretroviral establecidas en sus regiones de origen, podrían afectar a la transmisión de variantes del VIH-1 resistentes. Por lo tanto, en este capítulo se desglosa el estudio de los cambios en la tasa de MRT en la última década en una gran muestra de pacientes adultos infectados por VIH *naïve* para el tratamiento antirretroviral, teniendo en cuenta su origen y otras características epidemiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se incluyeron un total de 732 pacientes infectados por el VIH-1 y diagnosticados entre 1996 y 2010, con al menos una secuencia del gen *pol* anterior a cualquier tratamiento antirretroviral y obtenida a partir de plasma para la determinación rutinaria de resistencias a ARV. Estos pacientes se encontraban en seguimiento clínico en distintos centros de la Comunidad de Madrid: Hospital Carlos III (260 pacientes; 35,5%), Centro Sanitario Sandoval (217; 29,6%), Hospital Ramón y Cajal (218; 29,8%), Hospital 12 de Octubre (19; 2,6%) y Hospital de Móstoles (18; 2,6%). Según el lugar de nacimiento, 292 pacientes eran españoles, 226 africanos subsaharianos, 114 latinoamericanos, 26 europeos del este (incluyendo Rusia), 20 europeos occidentales o norteamericanos, 3 norteafricanos, 2 asiáticos y 49 tenían origen desconocido. Los países de procedencia más frecuentes para los subsaharianos fueron Guinea Ecuatorial (111 pacientes), Nigeria (28), Sierra Leona (10) y Liberia (7). Para los latinoamericanos, Ecuador (20), Argentina (15), Colombia (14), Brasil (13) y Cuba (13). Para los europeos del este, Rumanía (10) y Rusia (7). Finalmente, para los europeos occidentales los orígenes más frecuentes fueron Francia y Portugal (6 casos cada uno). Las secuencias *pol* del VIH-1 incluyeron los genes de PR y TI en 641 casos, únicamente la PR en 89 y sólo la TI en 2 ocasiones.

Resistencia a fármacos

La prevalencia de MRT se definió según la lista de mutaciones para vigilancia de la transmisión de resistencias que recomienda la Organización Mundial de la Salud (Bennett *et al.*, 2009) desglosada en el **Anexo II**. Para su identificación se utilizó la herramienta CPR (*Calibrated Population Resistance*), disponible en internet (**Anexo I**). La interpretación genotípica de esas mutaciones de resistencia se evaluó usando el algoritmo HIVdb de la Universidad de Stanford (Palo Alto, California, EE. UU.) versión 6.0.11 (**Anexo I**). Según dicho algoritmo, se clasificó cada secuencia en tres niveles de resistencia: sensible, intermedia y resistente.

Subtipaje del VIH-1

Mediante análisis filogenético de las secuencias *pol* se identificaron los subtipos y formas recombinantes circulantes (CRF) del VIH-1. Para ello se utilizó como referencia la versión 2008 del alineamiento de subtipos de referencia del Laboratorio Nacional de Los Álamos, EE. UU. disponible en internet (**Anexo I**). Las referencias incluían al menos dos secuencias representativas de cada uno de los 9 subtipos y los 43 CRF del grupo M del VIH-1 disponibles en el momento del análisis, utilizando como raíz la secuencia YBF30 del grupo N. Estas secuencias se alinearon utilizando el programa ClustalX versión 2.0.11 (**Anexo I**) y los árboles filogenéticos se generaron con el paquete informático PHYLIP (**Anexo I**). La topología de dichos árboles se obtuvo con el método de *neighbour-joining*, estimando la matriz de distancias entre pares utilizando el modelo de dos parámetros de Kimura como modelo de sustitución nucleotídica. Para medir la robustez de los árboles se llevó a cabo un remuestreo *bootstrap* con 1.000 repeticiones, estableciendo el límite en el que se considera como fiable un agrupamiento en 700.

Análisis estadísticos

Para la comparación de las variables continuas se utilizó la prueba *t* de Student, y para las categóricas, la prueba chi cuadrado o la exacta de Fisher, según lo apropiado. Asimismo, para evaluar la asociación entre factores epidemiológicos, clínicos y/o virológicos se realizó un análisis de regresión logística univariado y multivariado. El modelo máximo multivariado incluyó las variables de: origen del paciente, modo de infección por el VIH, subtipo del VIH y el periodo de infección.

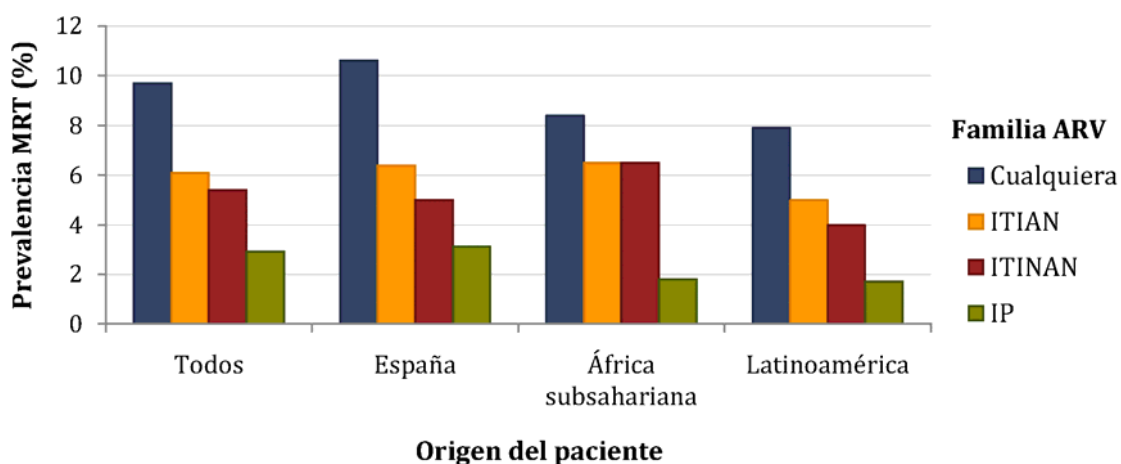
Por último, se analizaron los cambios en la prevalencia de resistencia a lo largo del tiempo utilizando una prueba chi cuadrado para tendencias (asociación lineal). Se estableció el límite de significación en 0,05 para los valores *P*. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

RESULTADOS

Prevalencia global de MRT en la población de estudio

La prevalencia de MRT global (es decir, a cualquier familia de ARV) entre los 732 pacientes en seguimiento clínico en Madrid entre 1996 y 2010 fue de 9,7% (**Figura 2.1**). Con respecto a la familia de fármacos ARV, la prevalencia de MRT en los pacientes del estudio fue de 2,9% para IP (3,1% en españoles, 1,8% en subsaharianos y 1,7% en latinoamericanos), 6,1% para ITIAN (6,4% en españoles, 6,5% en subsaharianos y 5% en latinoamericanos) y 5,4% para ITINAN (5% en españoles, 6,5% en subsaharianos y 4% en latinoamericanos).

Figura 2.1: Prevalencia de MRT a cada familia de fármacos según el origen de los pacientes.



La **Tabla 2.2** muestra las características principales de la población de estudio comparando pacientes infectados por virus silvestres con aquellos infectados por virus portadores de mutaciones de resistencia, no encontrando diferencias significativas entre ambas poblaciones de acuerdo a sus datos epidemiológicos o año de infección.

Tabla 2.2: Características de pacientes infectados con virus con MRT y pacientes con virus silvestre.

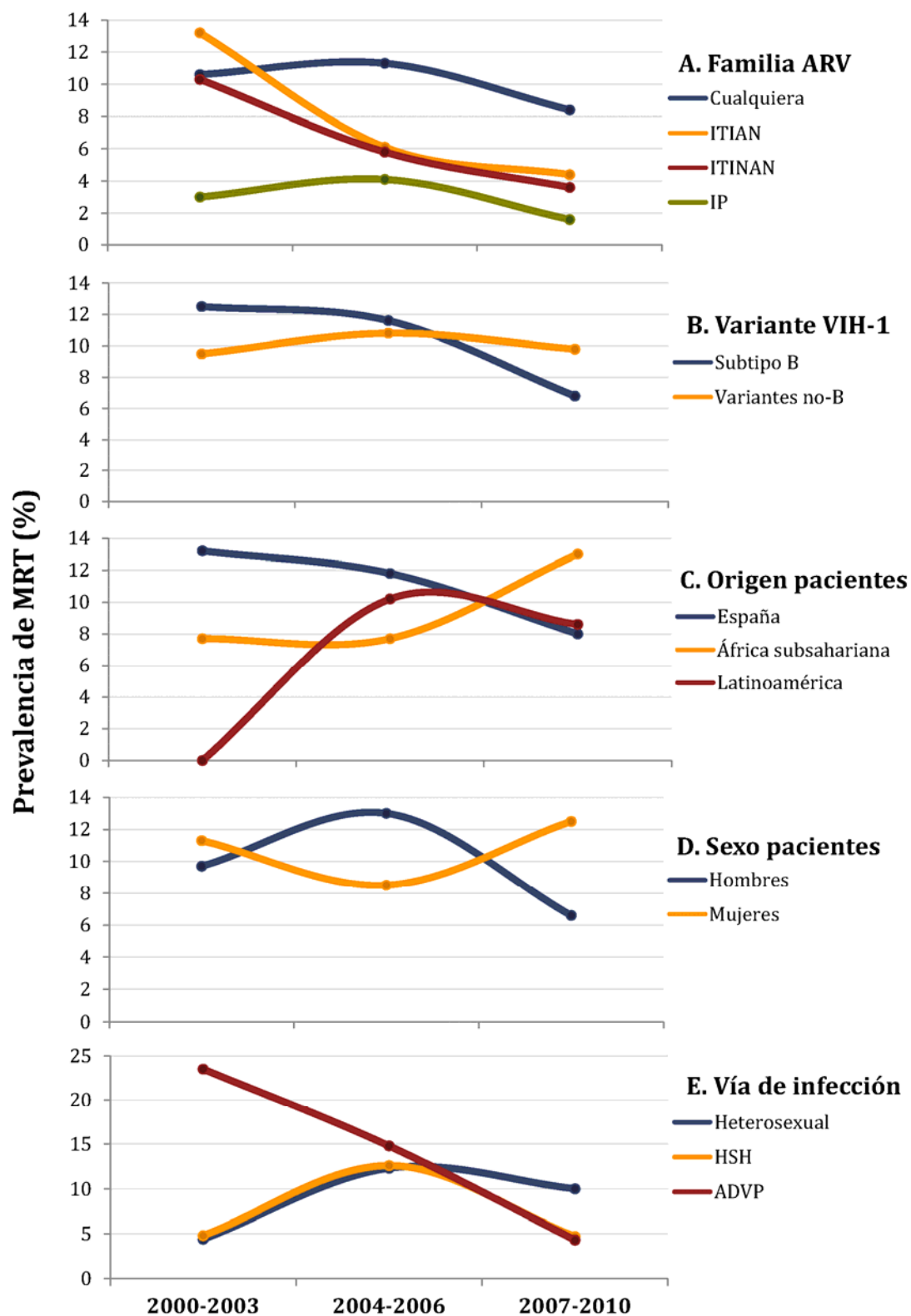
	Total	Con MRT	Sin MRT	Valor P	OR (IC 95%)
Pacientes (nº)	732	71 (9,7)	661 (90,3)	-	
Origen [nº (%)]					
España	292 (39,9)	31 (43,7)	261 (39,5)	0,5	1
África subsahariana	226 (30,9)	19 (26,8)	207 (31,3)	0,4	0,77 (0,42–1,40)
Latinoamérica	114 (15,6)	9 (12,7)	105 (15,9)	0,47	0,73 (0,33–1,58)
Otro	100 (13,7)	12 (16,9)	88 (13,3)	0,38	1,15 (0,57–2,33)
Sexo [nº (%)] ^a					
Hombre	469 (68,6)	47 (69,1)	422 (68,5)	0,92	1
Mujer	215 (31,4)	21 (30,9)	194 (31,5)	0,92	1,67 (0,50–5,58)
Riesgo [nº (%)] ^b					
Heterosexual	269 (49,4)	23 (44,2)	246 (50,0)	0,43	1
HSH	196 (36,0)	18 (34,6)	178 (36,2)	0,82	0,90 (0,46–1,78)
ADVP	68 (12,5)	9 (17,3)	59 (12,0)	0,27	1,58 (0,73–3,41)
Otro	11 (2,0)	2 (3,8)	9 (1,8)	0,33	1,22 (0,70–2,12)
Variante HIV-1 [n (%)]					
Subtipo B	383 (52,3)	39 (54,9)	344 (52,0)	0,64	1
Variantes no-B	349 (47,7)	32 (45,1)	317 (48,0)	0,64	0,89 (0,54–1,46)
Año de infección [nº (%)]					
<2000	32 (4,4)	0 (0)	32 (4,8)	-	
2000-03	132 (18,0)	14 (19,7)	118 (17,8)	0,82	1
2004-06	318 (43,4)	36 (50,7)	282 (42,7)	0,19	1,08 (0,56–2,07)
2007-10	250 (34,1)	21 (29,6)	229 (34,6)	0,39	0,78 (0,38–1,58)

^a Datos disponibles en 684 pacientes y ^b en 544 pacientes. El valor *P* corresponde a la prueba chi cuadrado y la *odds ratio* al análisis univariado.

Cambios de la tasa de MRT en el tiempo

Para evaluar la prevalencia de MRT a lo largo de los años, se agruparon las secuencias en tres periodos (2000-03, 2004-06 y 2007-10) según las tasas observadas cada año. Las muestras anteriores al año 2000 se incluyeron en las estimaciones globales pero se excluyeron de los análisis de tendencia debido a su bajo número ($n=32$) y representatividad, ya que todas fueron aisladas de pacientes inmigrantes. Entre los 732 pacientes de la población de estudio, la prevalencia de MRT fue de 10,6% en el primer periodo, 11,3% en el segundo y 8,4% en el tercero (P para tendencia=0,35). En los siguientes párrafos y en la **Figura 2.2** se detallan las prevalencias de MRT y sus tendencias según distintos factores.

Figura 2.2: Tendencias de la prevalencia de MRT en el tiempo en función de características epidemiológicas o virológicas.



Cambios en el tiempo según: A) la familia de ARV, B) la variante del VIH-1, C) el origen del paciente, D) el sexo y E) la vía de infección.

Según la familia de ARV. Como en la prevalencia global de MRT, la presencia de mutaciones de resistencia a IP transmitidas alcanzó su máximo en el periodo 2004-06 y descendió a su valor mínimo (1,6%) en el último periodo, 2007-10 (P para tendencia=0,23). Por otro lado, las tasas de resistencia tanto para ITIAN como ITINAN descendieron progresiva y significativamente a lo largo de los tres periodos: 13,2%, 6,1% y 4,4% para ITIAN (P para tendencia=0,03) y 10,3%, 5,8% y 3,6% para ITINAN (P para tendencia=0,04). Este descenso fue más pronunciado para mutaciones de resistencia a ITIAN, llegando a igualarse a los valores de resistencia a ITINAN en el último periodo (**Figura 2.2A**). En ese último periodo, la resistencia transmitida a cualquier inhibidor de la TI fue entre dos y tres veces superior que para IP ($P=0,06$).

Según las variantes del VIH-1. Se identificó al subtipo B en 383 pacientes (52,3%), y a los subtipos no-B y recombinantes del VIH-1 en 349 (47,7%). Entre estos últimos, las variantes más frecuentes fueron: CRF02_AG (128 pacientes), subtipo A (36), subtipo G (35), CRF12_BF (23) y subtipo C (22). Aunque la prevalencia de MRT global fue similar en subtipo B y variantes no-B (10,2% y 9,2%, respectivamente; $P=0,16$), su tendencia fue diferente (**Figura 2.2B**). En subtipo B, las MRT disminuyeron del 12,5% en 2000-03 al 6,8% en 2007-10 (P para tendencia=0,16), pero para formas no-B esta prevalencia fue estable (9,5% y 9,8% en los mismos periodos respectivamente; P para tendencia=0,99). De esta forma, la tasa de MRT en no-B en el último periodo superó a la encontrada en el subtipo B (9,8% y 6,8%; $P=0,54$).

Según el origen de los pacientes. Las prevalencias globales de MRT fueron de 10,6% para españoles, 8,4% para africanos subsaharianos y 7,9% para latinoamericanos (**Figura 2.1**). Con respecto a la tendencia en el tiempo (**Figura 2.2C**), la tasa de MRT descendió paulatinamente en españoles: 13,2% en 2000-03, 11,8% en 2004-06 y 8% en 2007-10 (P para tendencia=0,28). En latinoamericanos, no hubo MRT en 2000-03, pero la tasa alcanzó valores similares a los encontrados en españoles en los periodos siguientes: 10,2% en 2004-06 y 8,6% en 2007-10 (P para tendencia=0,47). Por el contrario, en subsaharianos la prevalencia de MRT permaneció estable en 2000-03 y 2004-06 (7,7% en ambos casos) pero aumentó hasta el 13% en 2007-10 (P para tendencia=0,27). De esta forma, en subsaharianos

se encontró la mayor frecuencia de MRT en el último periodo. Por último, la tasa de MRT fue muy alta entre europeos del este (5/26, 19,2%) y europeos occidentales (3/20, 15%) a pesar de que el limitado número de pacientes no permitió diferenciar las prevalencias según los periodos de tiempo.

Según el sexo de los pacientes. La mayoría (68%) de los sujetos con datos disponibles eran hombres (**Tabla 2.2**). La prevalencia global de MRT fue similar comparándola con la de mujeres (10% y 9,8%, respectivamente; $P=0,97$). Esta similitud también se observó en el periodo 2000-03 (9,7% y 11,3%; $P=0,77$), sin embargo, en los siguientes periodos sus tendencias se invirtieron (**Figura 2.2D**): la tasa de MRT creció en hombres y descendió en mujeres en 2004-06 (13% y 8,5%; $P=0,46$) y lo contrario en 2007-10 (6,6% y 12,5%; $P=0,21$). Este aumento en el último periodo podría ser debido al hecho de que el 61,4% de las mujeres incluidas en el estudio provenían de África subsahariana.

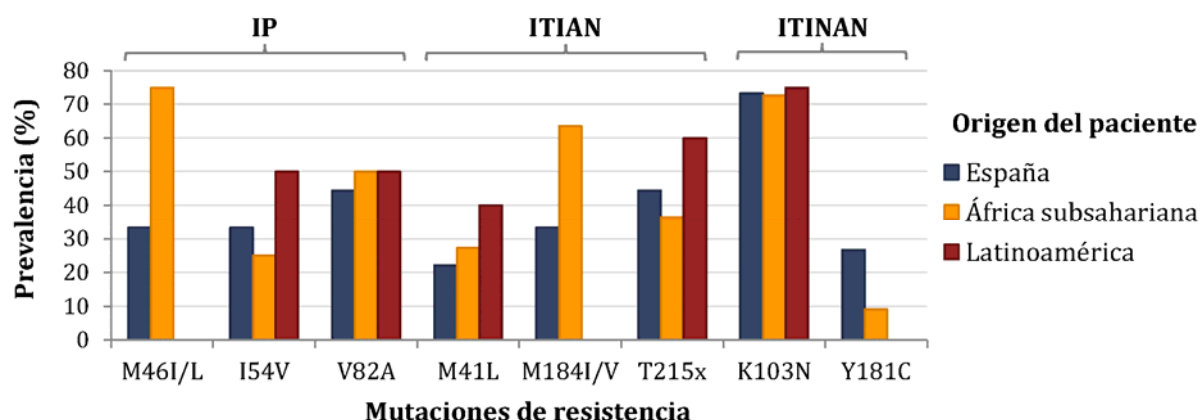
Según el modo de infección por VIH de los pacientes. La mitad de los pacientes (49,4%) con datos disponibles habían sido infectados por vía heterosexual (**Tabla 2.2**). La prevalencia global de MRT fue mayor en ADVP (13,2%) y similar en pacientes HSH (9,2%) y heterosexuales (8,5%). Con respecto a la tendencia en el tiempo (**Figura 2.2e**), se observó una drástica reducción en la tasa de MRT entre los 68 ADVP, la práctica de riesgo más frecuente entre infectados por VIH en España a finales de los años 90. Esta tasa de MRT fue 23,5% (4/17 pacientes) en 2000-03, 14,8% (4/27) en 2004-06 y 4,3% (1/23) en 2007-10 (P para tendencia=0,08). Entre los pacientes HSH, la prevalencia aumentó desde 2000-03 (4,7%) hasta 2007-10 (12,6) pero disminuyó hasta el valor inicial en el último periodo (4,7%) (P para tendencia=0,36). Finalmente, la tasa de MRT en heterosexuales pareció estabilizarse tras un aumento desde 2000-03 (4,4%) a 2004-06 (12,3%), y fue el grupo con la mayor prevalencia de MRT en el periodo 2007-10 (10%) ($P=0,32$).

Pacientes infectados con virus portadores de MRT

Entre los 71 pacientes portadores de resistencias (**Tabla 2.2**), 31 eran españoles, 19 subsaharianos, 9 latinoamericanos, 5 europeos del este, 3 europeos occidentales, 1 norteafricano y 3 tenían origen desconocido. En tres cuartos de los

casos (53 pacientes, 74,6%), las MRT afectaron a una única familia de ARV. Sin embargo, en 6 pacientes (el 8,4% de los infectados por virus resistentes, de los que 4 eran españoles, 1 subsahariano y 1 latinoamericano) se encontró virus con resistencias a las tres familias: IP, ITIAN e ITINAN. El patrón de mutaciones de resistencia fue diferente para ITIAN e IP según el origen de los pacientes (**Figura 2.3**). En subsaharianos, las mutaciones más frecuentes a ITIAN e IP fueron, respectivamente, M184I/V y M46L. Por su parte, tanto en españoles como en latinoamericanos las sustituciones más frecuentes fueron T215rev y V82A respectivamente. Por último, para la familia de ITINAN, la mutación de resistencia más frecuente en todos los grupos fue la K103N, aunque su mayor prevalencia se encontró en subsaharianos (4,7% de los casos). De hecho, la K103N fue la mutación predominante en todos los periodos, y se encontró en un tercio de los casos (15/45) donde la secuencia del gen *pol* presentaba una única sustitución.

Figura 2.3: Prevalencia de mutaciones individuales entre los pacientes infectados por virus portadores de MRT.



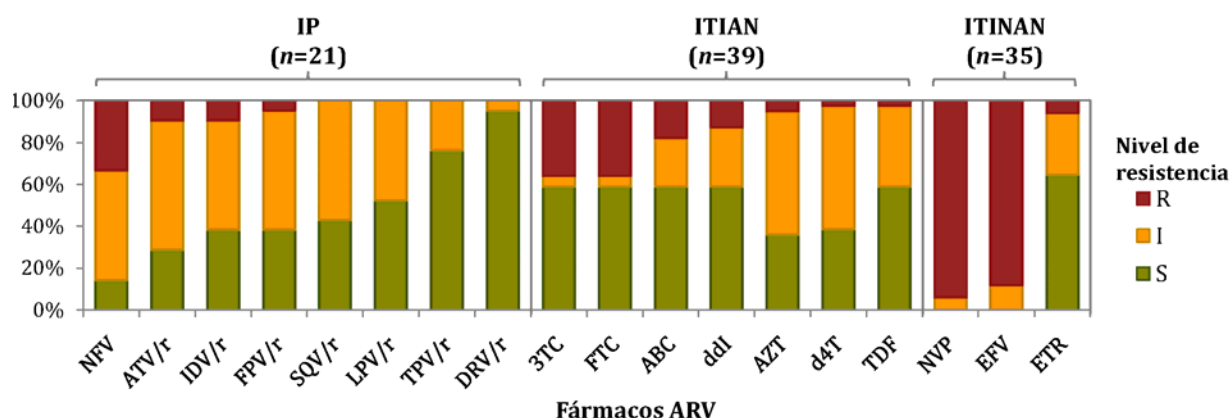
T215x corresponde a cualquier sustitución en la posición 215 de la TI.

La tendencia en el tiempo de las prevalencias de mutaciones específicas mostró reducciones significativas desde 2000-03 a 2007-10 para TAM (mutaciones de análogos de timidina, 8,8% a 2,4%; P para tendencia=0,03) y K103N (10,3% a 3,2%; P para tendencia=0,02). También se observó una reducción no significativa para M184I/V (4,4% a 2,4%; P para tendencia=0,67). El modelo logístico multivariado (**Tabla 2.2**) no mostró predictores significativos de MRT según el sexo, año o vía de infección por VIH u origen de los pacientes.

Implicaciones clínicas de las MRT

El análisis de la interpretación genotípica de resistencias de las 71 secuencias *pol* que incluían MRT (**Figura 2.4**) reveló que, especialmente en el caso de los fármacos de la familia de los IP, existían opciones para elegir un fármaco totalmente activo si esta elección se hace orientada por un informe de resistencias previo. De hecho, ninguno de los 21 pacientes con mutaciones de resistencia a IP presentó resistencia total (R) a todos los fármacos de dicha familia incluidos en el análisis, debido a su susceptibilidad a fármacos de nueva generación como darunavir o tipranavir. A pesar de esto, el nelfinavir fue el IP con el mayor porcentaje de secuencias R (7/21; 33,3%) por la presencia en PR de mutaciones como N88S y L90M que afectan a este fármaco más que al resto de IP. Entre los 39 pacientes con mutaciones de resistencia a ITIAN, sólo 5 (12,8%) presentaban algún nivel de resistencia a todos los fármacos de esa familia. Además, 14 (35,9%) y 16 (41%) eran totalmente susceptibles a las dos combinaciones de ITIAN más usadas, truvada (emtricitabina/tenofovir) y kivexa (lamivudina/abacavir). Por último, para los fármacos de la familia de ITINAN, ninguno de los 34 pacientes con mutaciones de resistencia era totalmente susceptible a nevirapina y efavirenz, los fármacos más usados en esta familia. Sólo etravirina podría tener algún nivel de actividad en estos pacientes.

Figura 2.4: Interpretación genotípica de la susceptibilidad a fármacos en los 71 casos de secuencias *pol* con MRT.



Se indica el porcentaje de secuencias que, conteniendo alguna mutación de resistencia para la familia de fármacos, son asignadas a cada nivel de resistencia (ver fármacos en el apartado **Abreviaturas**).

Diferencias en la carga viral del VIH

La media de CV plasmática en aquellos pacientes infectados por variantes del VIH portadoras de MRT fue significativamente menor a la de los pacientes infectados por virus silvestre (4,1 y 4,4 log de copias ARN-VIH/ml; $P=0,03$). Este resultado también se obtuvo al comparar pacientes infectados por virus portadores o no de la mutación M184I/V (3,9 y 4,4 log; $P=0,04$). De igual manera, los hombres presentaron una carga viral mayor que las mujeres (4,5 y 4,2 log; $P=0,001$) en el momento del muestreo. Por el contrario, no hubo diferencias en la viremia plasmática según origen, modo o año de infección por VIH o subtipo del virus en la población de estudio.

DISCUSIÓN

En este capítulo se analizó la evolución de la tasa de MRT en una población de 732 pacientes infectados por VIH-1 diagnosticados en Madrid entre 1996 y 2010 teniendo en cuenta: familia de fármacos afectada por las MRT, variante del virus, origen y sexo de los pacientes y forma de infección. La prevalencia global de MRT encontrada (9,7%) fue similar a la de los estudios europeos más representativos de los últimos años, donde se ha estabilizado alrededor del 10% (UK Cohorts, 2007; Chaix *et al.*, 2009; Vercauteren *et al.*, 2009; Wittkop *et al.*, 2011). En EE. UU. la prevalencia de MRT es mayor que en Europa, pero también ha comenzado a estabilizarse (Jain *et al.*, 2010). Según los resultados de este trabajo, la prevalencia de MRT a la familia de ITIAN está descendiendo claramente en Madrid hasta alcanzar los niveles para ITINAN, como se ha visto en otros países desarrollados (UK Cohorts, 2007; Vercauteren *et al.*, 2009). Además, en tres cuartos de los casos la transmisión de resistencias afecta una única familia de fármacos ARV.

La estabilización de las tasas de MRT se debe, entre otros motivos, a la eficacia y el acceso universal del TARGA en Europa. Sin embargo, en otras regiones sin un tratamiento eficaz disponible de forma regular para toda la población infectada, es esperable la aparición y transmisión de variantes resistentes. Así, se deduciría que la tasa de MRT observada previamente en países desarrollados será observada en las regiones en desarrollo a medida que los programas de tratamiento ARV sean establecidos. De esta forma, las bajas prevalencias de MRT encontradas en los

últimos años en regiones en desarrollo con una reciente introducción del TARGA (Agwale *et al.*, 2006; Djoko *et al.*, 2010) serían seguidas por un pico como el descrito en Europa alrededor de los años 2002 y 2003. Este fenómeno ya ha sido encontrado en regiones africanas con una política de dispensación de ARV más antigua (Hamers *et al.*, 2011; Ndembu *et al.*, 2011). En el presente estudio se describe una prevalencia creciente de MRT en los pacientes subsaharianos, al contrario que en pacientes autóctonos, que siguen las tendencias generales en Europa Occidental. Como se comenta en el **Capítulo 1** de esta Tesis, se ha descrito previamente una mayor tasa de pérdidas de seguimiento clínico en pacientes subsaharianos en tratamiento en nuestro país, probablemente debida a un menor nivel educativo y a su movilidad geográfica en busca de empleo (Pérez Molina *et al.*, 2010), lo que contribuye a que las variantes portadoras de resistencia a fármacos pueden aparecer y circular entre pacientes subsaharianos tratados y finalmente producir eventos de transmisión de mutaciones dentro de este colectivo. Dado que los pacientes subsaharianos ocasionalmente viajan a España para recibir tratamiento antirretroviral y después regresar a sus países de origen, la transmisión en este colectivo de variantes del VIH resistentes podría suceder tanto en África como en España. Sin embargo, la tendencia creciente en la prevalencia de MRT en subsaharianos, la alta prevalencia de variantes no-B entre ellos, y el patrón diferente de MRT encontrado en subsaharianos comparado con el encontrado en españoles nativos sugeriría que estos pacientes africanos se habrían infectado en sus países de origen.

Por otra parte, no se observaron MRT entre los 18 pacientes latinoamericanos incluidos en el primer periodo de estudio (2000-03). Esto podría ser debido a su bajo número o a un acceso limitado al tratamiento en sus países de origen en esos años. Sin embargo, en los siguientes periodos, ya con mayor número de pacientes, las tasas de MRT alcanzaron valores similares a las encontradas en españoles. Actualmente, se espera que la tendencia en la tasa de MRT en pacientes latinoamericanos sea similar a la de españoles, ya que los programas de terapia ARV han estado funcionando en la mayoría de América Latina durante al menos una década (OMS, 2010). Además, la presencia de variantes no-B del VIH-1 típicas de ciertas regiones de América (como los recombinantes BF en Argentina, Brasil y

Chile y los BG en Cuba) en este grupo de pacientes sugiere que estas infecciones tuvieron lugar probablemente antes de su llegada a España. A pesar de su baja representación, los pacientes tanto de Europa Occidental como Oriental (20 y 26 pacientes, respectivamente), mostraron prevalencias de MRT mayores al 15%. No obstante, estos pacientes con variantes del VIH portadoras de resistencias fueron diagnosticados antes de 2006 y eran mayoritariamente ADVP, aspectos relacionados con una mayor presencia de MRT según los resultados.

Con respecto al subtipo del VIH-1, se encontró una mayor prevalencia de MRT en el último periodo (2007-10) en pacientes infectados por variantes no-B frente a los infectados por el subtipo B. Esto se debió a la tendencia decreciente en la MRT en subtipo B en contraste con la estabilización entre variantes no-B. Esto coincide con resultados de otro estudio que refleja una tasa creciente de MRT en variantes no-B frente al subtipo B (Sagir *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estudios muestra mayores tasas de MRT en subtipo B (UK Cohorts, 2007; Yerly *et al.*, 2007; Chaix *et al.*, 2009; Vercauteren *et al.*, 2009), aunque todos ellos describen las prevalencias absolutas en el periodo total de estudio y no las tendencias en el tiempo según subtipo. Por otra parte, los resultados aquí presentados podrían estar sesgados por la alta representación de los pacientes subsaharianos entre las variantes no-B. De hecho, excluyendo los pacientes subsaharianos, los no-B mostraron una prevalencia de MRT que disminuyó del 15,8% en el primer periodo al 6,1% en el último. Por lo tanto este aumento sería debido al origen de los pacientes y no a la variante del virus. Igualmente, la correlación entre el subtipo viral y el origen de los pacientes pudo enmascarar las diferencias encontradas en los patrones de mutaciones descritos, estando éstas probablemente causadas por las diferentes estrategias de uso de ARV en esas regiones.

La prevalencia de la mutación M184I/V en españoles fue sorprendentemente alta (4,4%), teniendo en cuenta que esta sustitución suele ser rápidamente eliminada al provocar al virus (en ausencia de tratamiento) una reducción de la capacidad replicativa (Jain *et al.*, 2011). Su presencia podría deberse a tratamientos previos no registrados o por diferencias en el tiempo transcurrido entre el momento de la infección y la toma de la muestra. Por este coste para el virus, ya se había sido descrito previamente una carga viral significativamente

menor en pacientes infectados por virus con esta sustitución (Harrison *et al.*, 2010). Por otra parte, la carga viral también fue significativamente menor en mujeres frente a hombres, aspecto también observado anteriormente (Collazos *et al.*, 2007).

Según la vía de infección, hubo una disminución en la tasa de MRT a lo largo de los tres periodos entre pacientes ADVP. Este hecho puede ser consecuencia del cambio observado en la epidemia de VIH en España y del mejor cumplimiento del tratamiento entre la población ADVP debido al éxito de las campañas de prevención enfocadas a este colectivo. En los últimos años de la década de los 90 el uso de drogas inyectables era claramente la principal vía de infección por VIH, pero estos niveles de infección entre ADVP descendieron drásticamente a la vez que aumentaba la transmisión del virus debido a relaciones sexuales de riesgo (SINIVIH, 2011).

Según la interpretación genotípica de resistencia, las mutaciones transmitidas afectaron principalmente a la familia de los ITINAN, la recomendada como primera opción terapéutica en España por las guías clínicas (GeSIDA, 2012). Esta resistencia a ITINAN se debió principalmente a la transmisión de la mutación K103N en la TI del virus, que fue la más frecuentemente encontrada en el estudio, especialmente en pacientes subsaharianos, y que afecta seriamente al uso de los ITINAN efavirenz o nevirapina. Sólo etravirina, el ITINAN de segunda generación aprobado únicamente para tratamientos de rescate, podría tener algún nivel de actividad en los pacientes infectados por variantes virales portadoras de K103N. Por lo tanto, el ensayo de resistencias anterior a la elección del primer TARGA está altamente justificado. En países desarrollados hay opciones terapéuticas como los ITINAN e IP de nueva generación e incluso nuevas familias como inhibidores de la integrasa o de la entrada viral. Desafortunadamente, éstas no están disponibles en países en desarrollo, donde la resistencia a ITINAN entre pacientes *naïve* está aumentando (Ndembi *et al.*, 2011). Esto concuerda con el hecho de que, en este estudio, la mayor prevalencia de resistencias a ITINAN se encontró en pacientes de África subsahariana. Sin embargo, en algunos casos esto podría deberse a un uso profiláctico de nevirapina, práctica frecuente en África, que no quedara registrado en la historia clínica del paciente. Los resultados expuestos sugieren que los

fármacos IP podrían ser activos en la mayoría de los pacientes *naïve* a pesar de estar infectados por virus con mutaciones de resistencia a esta familia si el tratamiento se elige según el ensayo de resistencias.

El número limitado de pacientes, por ejemplo entre Europeos Occidentales y del Este, no permitió un mayor apoyo estadístico para las tendencias en las tasas de MRT. La delimitación del estudio en periodos de tiempo puede también ser una fuente de sesgo a pesar de que fueron elegidos para reflejar la tendencia anual lo más fielmente posible. Además, los pacientes subsaharianos podrían estar sobrerrepresentados con respecto a la epidemia general en España por la atención especial que reciben en las unidades de medicina tropical de los hospitales incluidos. Especialmente numerosos son los pacientes de Guinea Ecuatorial, debido a las peculiares relaciones con este país por ser antigua colonia española. No obstante, la proporción de inmigrantes en la población general de la Comunidad de Madrid se ha triplicado en la última década (5,7% en 2001 y 16,7% en 2010), por lo que el estudio específico de esta población está justificado.

En resumen, la prevalencia de MRT en Madrid sigue la tendencia general descrita en Europa occidental. Esta tasa ha disminuido especialmente para las mutaciones que afectan a los ITIAN. Sin embargo, ha evolucionado de forma distinta según el origen de los pacientes. Mientras que en españoles nativos y en latinoamericanos la prevalencia de MRT disminuyó en este estudio, ésta creció entre pacientes subsaharianos. Esto se podría deber a las especiales características socio-culturales de este colectivo, lo que podría comprometer tanto el cumplimiento de la terapia como su seguimiento clínico. Dado que se estima que la presencia de MRT tenderá a crecer en países en desarrollo a medida que instauren programas de dispensación de ARV, los resultados presentados resaltan la importancia de realizar una vigilancia de MRT específica en pacientes inmigrantes que vivan en regiones en desarrollo. Así se evitarán en el futuro posibles fracasos terapéuticos, especialmente a la hora de administrar fármacos de la familia de los ITINAN debido a la alta presencia de la mutación K103N.

El trabajo descrito en este capítulo fue publicado como artículo de investigación, incluido en el **Anexo III**.

CAPÍTULO 3

Caracterización filogenética y demográfica de la transmisión del VIH-1 en Madrid

ANTECEDENTES

El número de infectados por VIH-1 en España sigue siendo elevado (120.000 personas) a pesar del descenso en su incidencia en los últimos años (SINIVIH, 2011). El diseño de medidas de prevención para evitar la expansión del VIH requiere un conocimiento exhaustivo de la epidemiología del virus. Para contribuir a este conocimiento a nivel poblacional, los estudios filogenéticos se valen del creciente número de secuencias del gen *pol* del VIH-1 generadas durante la rutina clínica para los ensayos de resistencia genotípica. Debido a la gran diversidad genética del virus (por otra parte su mayor arma contra la eficacia de fármacos y posibles vacunas), estas secuencias *pol* aportan suficiente información para deducir y recrear la historia de la epidemia del virus (Hué *et al.*, 2004). De esta forma se han estudiado muchos aspectos de la biología evolutiva del VIH, epidemiología, orígenes, difusión geográfica del virus, dinámicas de transmisión, etcétera.

En concreto, estos estudios filogenéticos han sido aplicados para conocer múltiples aspectos epidemiológicos de relevancia para la salud pública. De esta forma, y en combinación con los datos generados por la epidemiología tradicional, han sido muy utilizados para conocer fenómenos de transmisión implicados en: la contribución relativa de las infecciones recientes en la propagación del virus (Pao *et al.*, 2005), la transmisión de mutaciones de resistencia a ARV en población no tratada (Hué *et al.*, 2009; Yerly *et al.*, 2009), la transmisión del virus en colectivos con prácticas de riesgo específicas como HSH (Lewis *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2010), población heterosexual (Hughes *et al.*, 2009) o ADVP (Skar *et al.*, 2011) y la introducción y expansión de diferentes variantes del VIH-1 en países occidentales (von Wyl *et al.*, 2011).

Además, en la última década se ha expandido el uso de los métodos filogenéticos que se basan en la inferencia estadística bayesiana, que fueron desarrollados a mediados de los años 90. Este tipo de métodos ha contribuido ostensiblemente a este campo por su gran robustez estadística y por las ventajas que suponen frente a los métodos tradicionales. Entre estas ventajas se encuentra la posibilidad de incorporar en los análisis moleculares conocimientos anteriores, en forma de datos

previos (*priors*). Éstos pueden ser tanto parámetros concretos previamente estimados como hipótesis evolutivas sobre cómo se comporta la población viral desde un punto de vista demográfico. Además, permiten integrar en un único análisis datos de múltiples fuentes. Por ejemplo, para cada muestra se pueden introducir datos sobre el momento de su toma. Así, se consigue datar las filogenias, es decir, construir los árboles filogenéticos dentro de un contexto temporal. De esta manera se pueden deducir los momentos en los que tuvo lugar cada evento de transmisión del VIH y su ritmo de propagación en periodos de tiempo determinados.

En este capítulo se describen las redes de transmisión del VIH-1 formadas por pacientes diagnosticados en distintos hospitales de Madrid e identificadas mediante métodos filogenéticos que aplican la inferencia bayesiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la cohorte

Se recopilaron 1.293 secuencias parciales del gen *pol* del VIH-1 de pacientes diferentes atendidos en diferentes hospitales con unidades de VIH/sida en Madrid, muestreadas entre 1995 y 2010 y previamente publicadas (Holguín *et al.*, 2008a; Yebra *et al.*, 2010). Se recogió la información disponible sobre el sexo, forma de infección por VIH-1 y país de origen de los pacientes, así como la fecha de toma de muestra. En total, 798 (61,7%) pacientes eran *naïve* para el tratamiento ARV en el momento del muestreo. En aquellos con varias secuencias disponibles, se escogió la secuencia más antigua para los pacientes *naïve* y la más reciente para aquellos en tratamiento. De esta forma se aumenta la probabilidad de detectar las mutaciones de resistencia circulantes en la población. En 1.189 casos (92%) la secuencia *pol* incluía la PR entera (297pb) y la TI parcial (833pb de media). En 104 casos (8%) solo se disponía de la secuencia de la PR. Con respecto a la forma de infección por VIH-1, 373 pacientes (44,9%) declararon transmisión por relaciones heterosexuales, 326 (39,2%) eran HSH, 114 (13,7%) eran ADVP y 18 (2,2%) se infectaron por otras vías. Para 462 pacientes (35%) la forma de transmisión no pudo ser registrada. En los pacientes con dato del sexo conocido (79,8% de casos), 722 eran hombres (70%) y 310 mujeres (30%). Según el origen (como lugar de

nacimiento) de los pacientes, 613 (47,4%) eran españoles, 300 (23,2%) africanos subsaharianos, 217 (16,8%) latinoamericanos, 49 (3,8%) provenían de otros países de Europa Occidental o de EE. UU., 36 (2,8%) de Europa del Este o Rusia y el resto (78, el 6%) eran originarios de otras regiones o de procedencia desconocida.

Subtipaje del VIH-1

Los subtipos y CRF habían sido identificados previamente mediante análisis filogenético de las secuencias *pol*. Se incluyeron como referencias al menos 2 secuencias representativas de cada uno de los 9 subtipos y los 49 CRF descritos en el momento del análisis, descargadas de la base de datos del Laboratorio Nacional de Los Álamos de EE. UU. (**Anexo I**). Se tomó como raíz la secuencia YBF30, del grupo N del VIH-1. Las secuencias se alinearon usando el programa ClustalX versión 2.0.11 (**Anexo I**). El árbol filogenético se obtuvo usando el programa PHYLIP (**Anexo I**) mediante el método de distancia *neighbour-joining* con el modelo de sustitución nucleotídica de dos parámetros de Kimura. Para comprobar la robustez estadística del árbol, se aplicó un remuestreo tipo *bootstrap* con 1.000 repeticiones. Se consideró un límite de 700 en el valor dicho *bootstrap* como límite para un agrupamiento fiable. De esta forma, las secuencias pertenecían a los subtipos A ($n=49$, 3,8%), B ($n=814$, 62,9%), C ($n=29$, 2,2%), D ($n=8$, 0,6%), F ($n=26$, 2%), G ($n=53$, 4,1%), H ($n=7$, 0,5%), al recombinante CRF02_AG ($n=177$, 13,7%) y a otros subtipos y recombinantes ($n=130$, 10%). Para los análisis posteriores, se agruparon algunos CRF muy cercanos que compartían patrones de recombinación muy similares, siguiendo la sugerencia de (Zhang *et al.*, 2010). Específicamente, se agruparon los recombinantes BG de origen cubano (incluyendo CRF20, CRF23 y CRF24) en una familia y los recombinantes BF (CRF12, CRF17 y CRF47) en otra.

Mutaciones de resistencia a fármacos ARV

La prevalencia de mutaciones de resistencia a fármacos en toda la población se definió según la lista de MRT recomendada por la Organización Mundial de la Salud (Bennett *et al.*, 2009) usando la herramienta CPR (**Anexo I**).

Detección de clusters¹ de transmisión

Las secuencias fueron divididas en tres alineamientos: a) secuencias de subtipo B ($n=814$), b) recombinante CRF02_AG ($n=177$) y c) variantes no-B, no-CRF02 ($n=302$). Para hacer una primera selección de las secuencias potencialmente involucradas en clusters de transmisión se calcularon las distancias genéticas sin corregir (distancias p) entre cada par de secuencias, utilizando el programa PAUP* versión 4.0beta10 (**Anexo I**). Según un estudio previo (Lewis *et al.*, 2008), las secuencias cuya distancia genética con cualquier otra secuencia del alineamiento sean mayores a 0,045 nucleótidos diferentes por posición (es decir, el 4,5% de bases diferentes) podrían ser descartadas de formar parte de un posible evento de transmisión. Por lo tanto, se seleccionaron aquellas por debajo de este límite del 4,5%. Comprobando las distancias genéticas también se detectan posibles secuencias duplicadas (pares de secuencias con una distancia genética de cero).

Cada secuencia seleccionada fue comparada con secuencias de todo el mundo disponibles públicamente mediante la herramienta BLAST del NCBI (**Anexo I**) para identificar posibles muestras adicionales que pudieran estar incluidas en las redes de transmisión. Un total de 2.003 secuencias (1.043 de la cohorte y 960 de bases de datos de VIH públicas) se usaron para construir árboles filogenéticos mediante máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML) seleccionando como modelo de sustitución nucleotídica el GTR+ Γ , que tiene en cuenta diferentes tasas de sustitución en diferentes posiciones del alineamiento según una distribución Γ . Estos árboles ML se construyeron con el programa RAxML versión 7.2.8-alpha para las variantes no-B y FastTree versión 2.1.3 (**Anexo I**) para el subtipo B por el mayor número de secuencias. RAxML comprobó la robustez estadística de las topologías de los árboles mediante un remuestreo tipo *bootstrap* con 1.000 réplicas y FastTree hizo lo propio mediante el indicador llamado “apoyo local de cada rama” (*local branch support*). Se seleccionaron las secuencias que en el árbol ML resultaban incluidas en clusters monofiléticos con un apoyo estadístico de al menos el 80%. La robustez de estos clusters se comprobó reconstruyendo los árboles incluyendo sólo la tercera posición de cada codón del alineamiento. En el

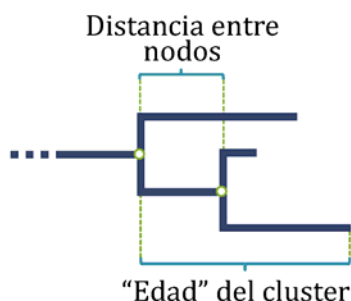
¹ Por conveniencia y por su amplia utilización entre los usuarios de herramientas filogenéticas, se ha mantenido en esta Tesis el uso del anglicismo “cluster” y su plural “clusters” para referirse a agrupaciones filogenéticas de secuencias con un origen común.

caso del alineamiento de subtipo B, el árbol ML fue repetido también tras eliminar los codones que codificaban aminoácidos asociados con mutaciones de resistencia principales según la lista de la IAS-USA de 2010 (**Anexo II**). Así se descartan posibles agrupamientos artificiales debido a evolución convergente como respuesta a la presión selectiva del TARGA.

Las filogenias datadas, es decir, que incluían una estimación temporal, se obtuvieron utilizando un análisis bayesiano implementado en el programa BEAST versión 1.6.1 (Drummond y Rambaut, 2007). Éste se vale, para el muestreo en el espacio de árboles y parámetros posibles, del algoritmo heurístico denominado como cadenas de Markov-Montecarlo (*Monte Carlo Markov Chain*, MCMC). Se estableció como modelo demográfico de coalescencia el denominado como *Bayesian Skyline*. Asimismo, se introdujo un valor previo (*prior*) con distribución log-normal para el número de sustituciones por nucleótido por año, es decir, la tasa de evolución, basándose en estimaciones previas de esta tasa en el gen *pol* del VIH-1 (Hué *et al.*, 2005). La media de este valor fue de $2,8 \times 10^{-3}$ (desviación típica: 0,5) y varió según el alineamiento de partida. La cadena MCMC se dispuso para 2×10^8 generaciones (rondas de muestreo) para los alineamientos de subtipo B y CRF02_AG y para 10^8 generaciones para el alineamiento con el resto de variantes no-B, no-CRF02. Cada 1.000 generaciones se estimaron tanto parámetros como árboles. Se comprobaron las hipótesis evolutivas que explicaban mejor los datos para tanto el reloj molecular (estricto o relajado) como el modelo de sustitución nucleotídica (SRD06 o GTR+ Γ). Para comprobar el modelo más adecuado se utilizó el factor de Bayes (BF) en comparaciones dos a dos, con el programa Tracer versión 1.5 dentro del paquete BEAST. En todos los casos las opciones que se adecuaban mejor a las muestras fueron utilizar un reloj molecular relajado con distribución log-normal asociado al modelo SRD06 de sustitución nucleotídica (Shapiro *et al.*, 2006), dado que estas opciones arrojaban valores del log BF >10 al compararlas con sus alternativas, lo que es prueba de un fuerte apoyo estadístico. Las muestras de árboles se resumieron en uno solo con el programa TreeAnnotator versión 1.6.1 generando un árbol consenso de máxima credibilidad de los clados (*maximum clade credibility tree*, MCCT), descartando previamente el primer 10% de las estimaciones (descarte denominado como *burn-in*). El MCCT,

por definición, es aquel árbol, de entre todos los muestreados, que incluye la suma máxima de las probabilidades posteriores de los clados incluidos. Los clusters de transmisión aceptados como definitivos fueron aquellos que cumplían dos condiciones: a) el apoyo estadístico de una probabilidad posterior $\geq 0,9$ en los árboles bayesianos, y b) una “edad” que fuera menor a 6 años para las variantes no-B y menor a 8 años para el subtipo B. La edad fue definida como el tiempo máximo que separa el nodo ancestral con la muestra más reciente incluida dentro del cluster, ver **Figura 3.1**.

Figura 3.1: Esquema de la estructura de un cluster de secuencias genéticas con sus elementos.

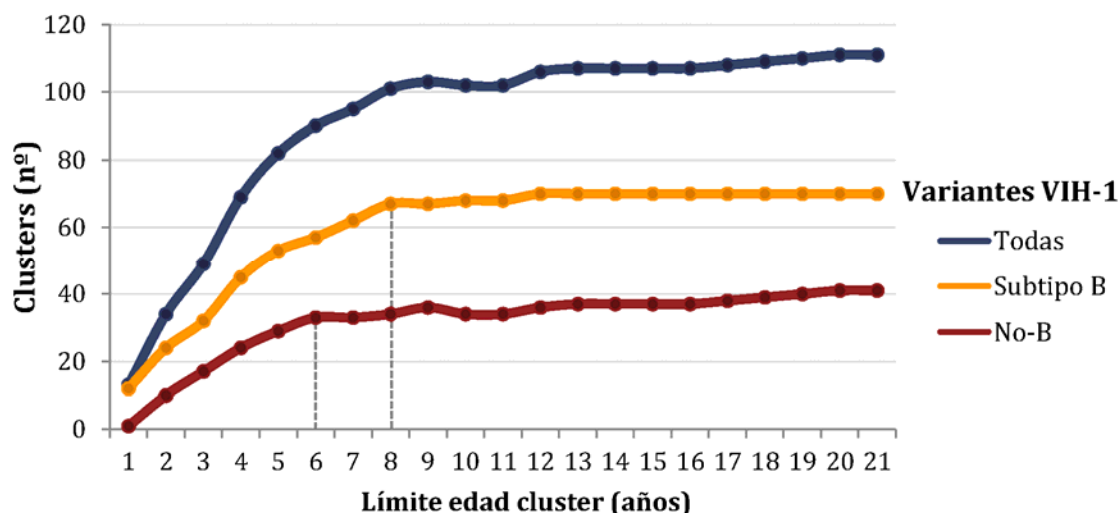


Como se muestra en la **Figura 3.2**, estos valores fueron estimados empíricamente para maximizar el número de clusters incluidos y a la vez minimizar la edad de dichos clusters. De esta forma se aumenta la probabilidad de que estos clusters sean fuentes locales y activas de nuevas transmisiones y, en el caso de pacientes inmigrantes, de que la transmisión del virus haya tenido lugar en Madrid.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre el agrupamiento en clusters con las características epidemiológicas o virológicas consideradas en el estudio. Para la comparación de las variables continuas se utilizó la prueba *t* de Student, y para las categóricas, la prueba chi cuadrado o la exacta de Fisher, según lo apropiado. Se estableció el límite de significación en 0,05 para los valores *P*. Los análisis se realizaron con el programa SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

Figura 3.2: Número de clusters de transmisión identificados según el límite en la edad utilizado para la definición de cluster.



Las líneas punteadas verticales indican los límites finalmente utilizados en el estudio.

RESULTADOS

Predictores de agrupamiento en cluster

Se encontraron un total de cien clusters de transmisión estadísticamente fiables, que incluían a 236 pacientes, el 18,2% de la cohorte. En la **Tabla 3.1** se muestran las características de la población total y según su inclusión en estas cadenas de transmisión. La regresión logística univariada mostró que la infección por relaciones homo/bisexuales y el sexo masculino fueron predictores significativos del agrupamiento en cluster. Al contrario, los pacientes subsaharianos, los ADVP y los infectados por virus portadores de mutaciones de resistencia eran significativamente menos proclives a estar incluidos en redes de transmisión. La prueba multivariada no pudo llevarse a cabo por las fuertes correlaciones entre el origen y otros factores como el modo de infección por VIH, la variante del virus y el sexo de los pacientes. Según el origen, la proporción de pacientes relacionados epidemiológicamente mediante clusters (**Figura 3.3**) fue similar en españoles (21%) y latinoamericanos (25,3%), en contraste con los pacientes subsaharianos, con solo un 9% de individuos incluidos en clusters ($P < 0,001$ para ambas comparaciones). Esta proporción fue de 33,3% para europeos del Este, 6,1% para europeos occidentales y 12,8% para otros orígenes o desconocidos. Según la forma de infección, esta proporción de pacientes incluidos en clusters fue significativamente mayor para HSH (24,2%) que para heterosexuales (16,1%;

$P<0,01$) y para ADVP (7,9%; $P<0,05$). Según el sexo de los pacientes, los hombres tenían una proporción de agrupamiento significativamente mayor que las mujeres (21% y 11,6%; $P<0,001$).

Tabla 3.1: Características de los pacientes incluidos o excluidos de clusters de transmisión detectados mediante análisis filogenético en *pol*.

	Total	Incluidos	Excluidos	P^a	OR (IC 95%)	P^b
Nº (%)	1.293	236	1.057			
Origen						
España	613 (47,4)	129 (54,7)	484 (45,8)	0,016	1	
África subsah.	300 (23,2)	27 (11,4)	273 (25,8)	<0,001	0,42 (0,27-0,64)	<0,001
Latinoamérica	217 (16,8)	55 (23,3)	162 (15,3)	0,004	1,16 (0,80-1,68)	0,42
Otros	163 (12,6)	25 (10,6)	138 (13,1)	0,36	0,752 (0,48-1,19)	0,22
Sexo ^c						
Hombres	722 (70)	152 (80,8)	570 (67,5)	<0,001	1	
Mujeres	310 (30)	36 (19,1)	274 (32,5)	<0,001	0,55 (0,37-0,80)	0,002
Riesgo ^d						
Heterosexual	373 (44,9)	60 (39,7)	313 (46)	0,19	1	
HSB	326 (39,2)	79 (52,3)	247 (36,3)	<0,001	1,78 (1,23-2,58)	0,002
ADVP	114 (13,7)	9 (6)	105 (15,4)	0,003	0,45 (0,21-0,93)	0,03
Otros	18 (2,3)	3 (2)	15 (2,2)	1	1,11 (0,77-1,59)	0,58
Variante VIH-1						
Subtipo B	814 (62,9)	157 (66,5)	657 (62,2)	0,24	1	
Formas no-B	479 (37,1)	79 (33,5)	400 (37,8)	0,24	0,85 (0,63-1,14)	0,27
Mutaciones						
No	1.020 (88,1)	208 (88,1)	812 (76,8)	<0,001	1	
Sí	273 (11,9)	28 (11,9)	245 (23,2)	<0,001	0,45 (0,29-0,68)	<0,001
Tratamiento						
Naive	798 (61,7)	152 (64,4)	646 (61,1)	0,39	1	
Tratados	495 (38,3)	84 (35,6)	411 (38,9)	0,39	0,87 (0,65-1,16)	0,35

^a Valor P para la prueba de chi cuadrado; ^b Valor P para la regresión logística univariada;

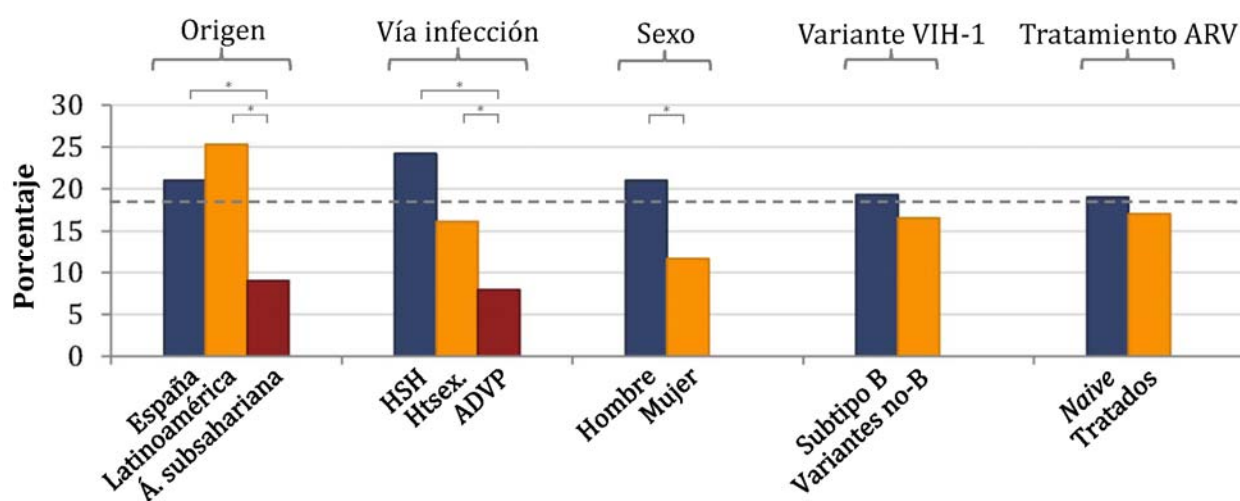
^c Datos disponibles para 1.032 pacientes; ^d Datos disponibles para 831 pacientes. En negrilla, los valores P significativos ($<0,05$).

Descripción de los clusters

Según la variante del VIH-1, 67 de los 100 clusters pertenecían al subtipo B. Los restantes 33 clusters pertenecían al sub-subtipo A5 ($n=1$), subtipos C ($n=5$), D ($n=1$), F1 ($n=2$), G ($n=4$), H ($n=1$) y recombinantes CRF02_AG ($n=8$), BG ($n=2$), BF

($n=7$), CRF10_CD ($n=1$) y URF_BC ($n=1$). Los clusters incluyeron 157 secuencias de subtipo B y 79 de variantes no-B. Setenta y siete (74,6% en subtipo B y 81,8% en no-B; $P=0,6$) eran pares de secuencias, mientras que el resto de los clusters estaban formados por 3 pacientes (16 clusters), 4 pacientes (4 clusters), 5 pacientes (2 clusters) y 8 pacientes (1 cluster). El tamaño medio de los clusters fue muy similar para las variantes no-B y para el subtipo B: 2,39 y 2,34 pacientes/cluster, respectivamente ($P=0,8$).

Figura 3.3: Proporción de pacientes de la cohorte incluidos en clusters de transmisión según sus características.



Htsex., pacientes con transmisión heterosexual. La línea punteada indica la proporción de pacientes incluidos en clusters en la totalidad de la cohorte (18,2%). El asterisco indica las comparaciones estadísticamente significativas según la prueba de chi cuadrado.

A pesar de que la información sobre la práctica de riesgo solo estaba disponible para 831 pacientes (el 64,3%) de la cohorte, los 100 clusters pudieron ser clasificados según el modo de infección principal en cada uno de ellos. Así, hubo 48 clusters de HSH (48%), 35 de transmisión heterosexual (35%), 5 clusters de ADVP (5%) y en 12 clusters (12%) no se pudo deducir la forma de infección por falta de datos o información discordante entre pacientes. El tamaño medio de las agrupaciones según la práctica de riesgo fue mayor, aunque no significativamente, para los clusters HSH que para los formados por heterosexuales: 2,48 y 2,2 pacientes/cluster, respectivamente ($P=0,12$).

La proporción de pacientes incluidos en las cadenas de transmisión fue mayor pero no significativamente para el subtipo B que para las variantes no-B (19,3% y 16,5%; $P=0,24$). Sin embargo, este valor varió mucho entre distintas cepas no-B del VIH-1: 76,9% en BG, 42,9% en H, 40,9% en BF, 34,5% en C, 25% en D, 15,4% en F, 15,1% en G, 9,6% en CRF02_AG y 4,1% en A. En el resto de variantes la tasa fue de 6,8%. Este valor fue sorprendentemente bajo para el CRF02_AG a pesar de su alta prevalencia en la población infectada por VIH en España. De hecho, fue la variante no-B más numerosa en esta cohorte (13,7%).

Para todas las cadenas de transmisión que incluían al menos 3 pacientes, se calcularon las distancias entre nodos en el árbol bayesiano datado para así estimar los intervalos máximos entre eventos de transmisión (**Figura 3.1**). No hubo diferencias significativas en la media de los intervalos de transmisión según subtipos: 1,55 años (~18 meses) en el subtipo B y 1,15 años (~14 meses) en los clusters no-B ($P=0,13$). Según el modo de infección, la media de las distancias entre nodos fue menor para los clusters de HSH (1,28 años; ~15 meses) comparada con los de transmisión heterosexual (1,56 años; ~18 meses), cercano a la significación estadística ($P=0,06$).

Origen de los pacientes incluidos en clusters de subtipo B

De los 157 pacientes incluidos en estos clusters, 101 (64,3%) eran españoles, 38 (24,2%) latinoamericanos (principalmente cubanos y ecuatorianos) y 18 (11,5%) tenían otros orígenes. Treinta y dos clusters de subtipo B incluían únicamente sujetos españoles, 9 solo latinoamericanos y 16 ambos. Por último, dos pares incluían solo pacientes rumanos y otro par dos pacientes de Guinea-Bissau.

Origen de los pacientes incluidos en los clusters no-B

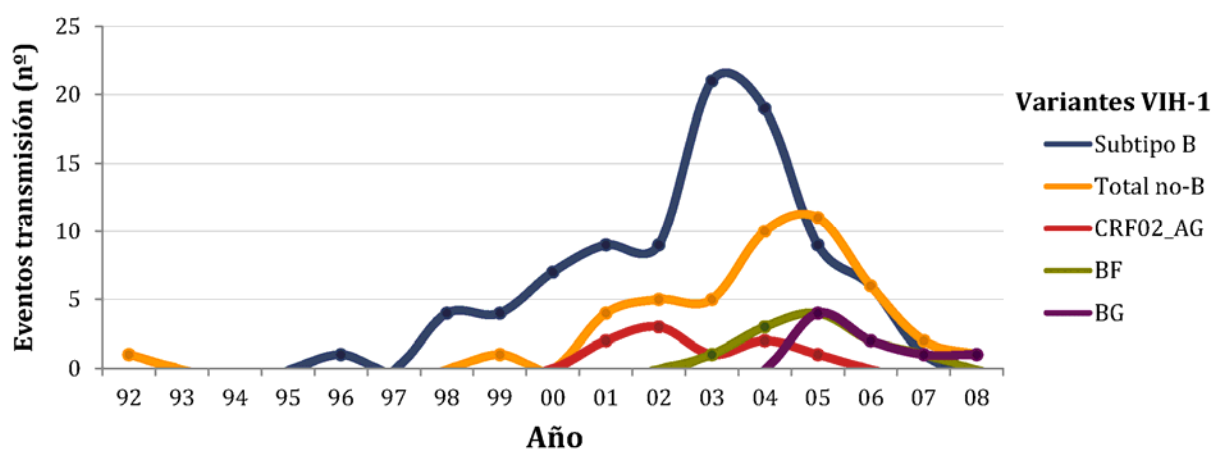
Los 33 clusters no-B incluyeron 79 pacientes: 28 (35,4%) españoles, 25 (31,6%) del África subsahariana (principalmente Guinea Ecuatorial y Nigeria), 18 (22,8%) de Latinoamérica (sobre todo Cuba y Ecuador), 4 de Rumanía y 4 con origen desconocido (5,1% cada uno). Casi la mitad (15/33, 45,4%) de las cadenas de transmisión de variantes no-B incluyeron al menos un paciente nacido en España. Entre éstos, 6 clusters incluyeron solo pacientes españoles, 5 agruparon tanto españoles como subsaharianos y 3 españoles y latinoamericanos. Los pacientes

subsaharianos encontrados en los clusters no-B estaban principalmente infectados, en este orden por el recombinante CRF02_AG y los subtipos G y C. Por otra parte, en los pacientes latinoamericanos se encontraron fundamentalmente recombinantes BF y BG. Sin embargo, se encontraron excepcionalmente dos clusters (un triplete y un par) de CRF02_AG incluyendo 4 ecuatorianos y 1 boliviano. Además, otros dos pares incluyeron un paciente latinoamericano y uno subsahariano. Por último, se encontraron sujetos españoles en cadenas de transmisión de variantes no-B tanto africanas como latinoamericanas. En cuanto a la vía de transmisión, los clusters no-B fueron fundamentalmente (22/33 casos, 66,7%) transmitidos por relaciones heterosexuales, al contrario de lo observado en los clusters de subtipo B que incluían mayoritariamente HSH (42/67, 62,7%).

Dinámica de la transmisión de variantes no-B del VIH-1

La fecha estimada para cada nodo interno dentro de cada cluster en los AF datados fue usada para estimar la frecuencia y distribución de los eventos de transmisión del VIH en el tiempo en función de las variantes virales. Esta distribución se representa en la **Figura 3.4** para las principales variantes, donde se puede observar un pico en el número de transmisiones entre 2000 y 2006.

Figura 3.4: Número de eventos de transmisión por año y variante viral.

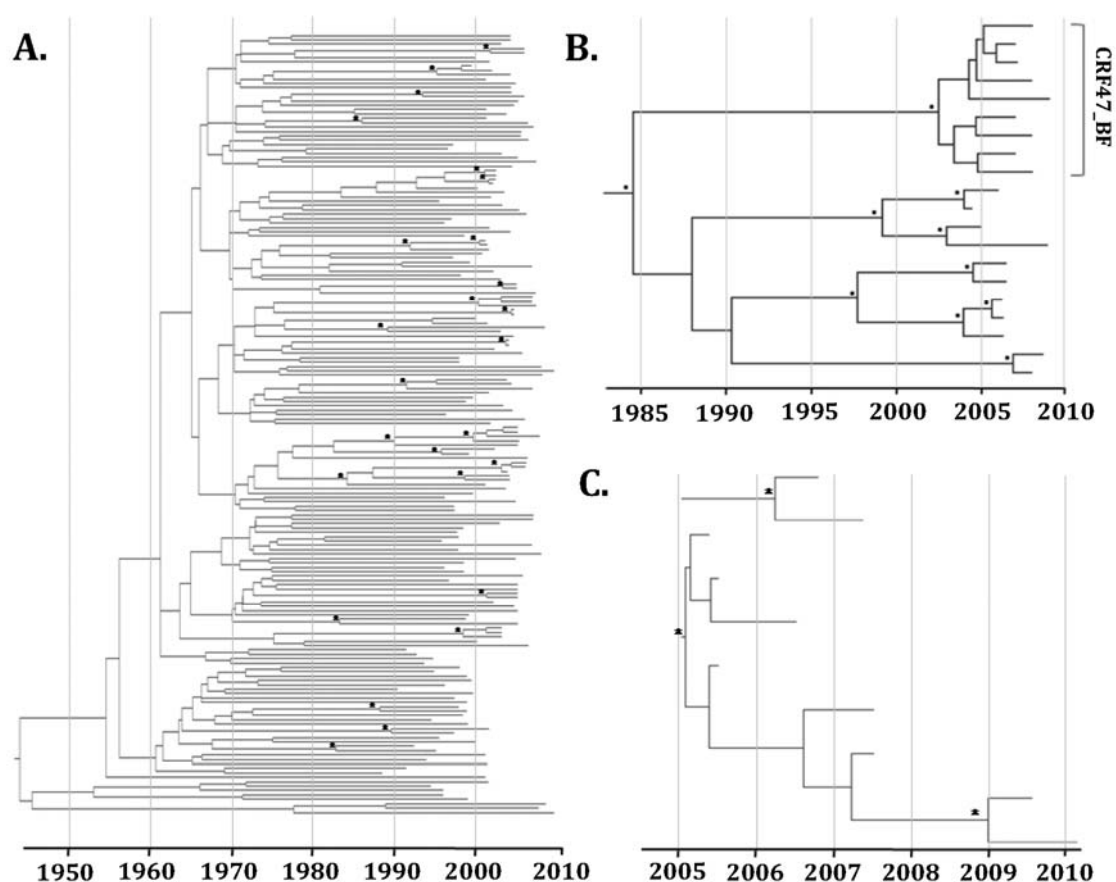


BF y BG incluyen, respectivamente, todos los recombinantes CRF_BF y CRF_BG.

Durante este periodo (2000-06), el número de transmisiones de subtipo B se duplicó a la vez que aparecían transmisiones de otras variantes. Aunque CRF02_AG fue la variante no-B más encontrada durante todo el periodo de estudio, sus eventos de transmisión no fueron muy frecuentes y estuvieron limitadas al periodo

2000-2006. Las transmisiones de recombinantes BF comenzaron en 2002 y alcanzaron un máximo en 2005 (4 transmisiones estimadas), junto con la repentina aparición de las variantes BG cubanas. De hecho, uno de los clusters BG fue el más numeroso de los detectados, incluyendo 8 pacientes: 3 pacientes cubanos, 3 españoles y 2 de origen desconocido. Por otra parte, 2 de los clusters BF (con 5 y 2 pacientes) pertenecían al recientemente descrito CRF47_BF (Fernández-García *et al.*, 2010), que se originó en Galicia en, según las estimaciones obtenidas aquí, el año 2002 (95% HPD, 1999-2005). La **Figura 3.5** muestra, como ejemplo de las filogenias datadas, los árboles de los recombinantes CRF02_AG, BF y BG.

Figura 3.5: Ejemplos de árboles filogenéticos datados reconstruidos a partir de la población de estudio.



A) Árbol incluyendo las 177 secuencias CRF02_AG de la cohorte; B) árbol de los 18 recombinantes BF incluidos en clusters; C) árbol de los 10 recombinantes BG incluidos en clusters. Los asteriscos indican aquellos nodos apoyados estadísticamente por una probabilidad posterior de 1. Los ejes horizontales están expresados en años.

Clusters que contienen mutaciones de resistencia a ARV

Diecinueve de los 100 clusters (19%) incluían al menos una secuencia portadora de mutaciones de resistencia. De ellos, 14 eran de subtipo B y 5 no-B. Según si estas mutaciones eran transmitidas (pacientes en un mismo cluster mostrando virus con las mismas mutaciones) o adquiridas, estos 19 clusters se clasificaron en: a) clusters con adquisición esporádica de resistencia ($n=11$), b) clusters con transmisión de resistencia a partir de pacientes con tratamiento ARV previo ($n=5$) y c) clusters con fenómenos de transmisión de resistencia independiente de tratamiento ($n=3$). Estos últimos son aquellos que incluyen transmisión de mutaciones de resistencia entre pacientes *naïve* sin aparecer en el cluster pacientes tratados como posible fuente de esa resistencia (Hué *et al.*, 2009). La **Tabla 3.2** muestra las características principales de los 8 pacientes *naïve* incluidos en las 3 cadenas de transmisión de ese último tipo.

DISCUSIÓN

En este estudio se caracterizó mediante filogenia las cadenas de transmisión de VIH-1 entre 1.239 pacientes (798 *naïve* y 495 tratados con ARV) atendidos en diferentes clínicas de Madrid, en cuya área metropolitana cocirculan numerosas y complejas variantes del VIH-1 (Holguín *et al.*, 2008a; González-Alba *et al.*, 2011). Se encontraron 100 cadenas de transmisión, que incluían 236 pacientes (18,2% de la cohorte) y 12 diferentes cepas del virus. En otras palabras, uno de cada cinco pacientes de la población de estudio estaba epidemiológicamente relacionado. Ya se ha comentado que, en la última década, la prevalencia de cada variante del VIH-1 ha cambiado en los distintos países desarrollados, con un aumento en la presencia de formas no-B (Gifford *et al.*, 2007; Yerly *et al.*, 2007; Frange *et al.*, 2008; Holguín *et al.*, 2008a; Brennan *et al.*, 2010; von Wyl *et al.*, 2011). La distribución de las variantes virales no solo varía entre los países, sino también entre distintos colectivos según la práctica de riesgo, dado que el perfil del paciente con frecuencia determina las diferencias en la dinámica de transmisión de cada subtipo.

Tabla 3.2: Características de los 3 clusters de secuencias virales encontrados incluyendo transmisión de resistencias independiente del tratamiento.

Información Cluster			Información pacientes							
Nº	Variante VIH-1	Fecha MRCA (95% HPD)	Nº	Origen	Sexo	Riesgo	Año muestra	Tratamiento	MR en PR	MR en TI
1	CRF12_BF	2005,00 (2002,9-2006,6)	1	Cuba	M	HSH	2006	Naive	I54V, V82A	-
			2	España	M	HSH	2006	Naive	I54V, V82A	-
2	B	2001,06 (1997,7-2004,4)	1	Ecuador	M	HSH	2006	Naive	-	K70R
			2	España	M	nc	2006	Naive	-	K70R
			3	España	M	nc	2007	Naive	-	-
3	B	2003,02 (2001,6-2005)	1	Brasil	M	HSH	2006	Naive	-	K103N
			2	España	M	HSH	2006	Naive	-	K103N
			3	España	M	HSH	2005	Naive	-	K103N

MRCA, ancestro común más reciente; MR, mutaciones de resistencia a fármacos; nc, desconocido.

Por ejemplo, las cadenas de transmisión de VIH que incluyen HSH, donde el subtipo B suele ser la variante más frecuente, tienden a ser más grandes y con un menor intervalo entre transmisiones al compararlas con las variantes no-B, fundamentalmente importadas de otros países y asociadas con la transmisión heterosexual (Lewis *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2009; Chalmet *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2010; Kouyos *et al.*, 2010; Brenner *et al.*, 2011). En este capítulo se muestra que las agrupaciones de HSH incluían más pacientes y una transmisión más rápida que las heterosexuales, en consonancia con los estudios referidos antes. Por otra parte, la inclusión en redes de transmisión de VIH-1 fue significativamente menos probable para ADVP, lo que refleja el gran cambio ocurrido en la subepidemia de ADVP en España desde los años 90, cuando ésta era la vía mayoritaria de infección por VIH. El origen subsahariano también fue asociado significativamente con un menor nivel de agrupación de las secuencias virales al compararlo con los pacientes latinoamericanos o españoles.

Con respecto al subtipo del VIH-1, el 19,3% de los pacientes infectados por subtipo B estaban incluidos en redes de transmisión, proporción que está dentro del rango (15-50%) encontrado en otros estudios enfocados en esta variante (Lewis *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2010; Kouyos *et al.*, 2010; Brenner *et al.*, 2011). Las cadenas de transmisión subtipo B en esta cohorte de Madrid estaban dominadas por pacientes españoles, pero también los latinoamericanos estaban muy representados. Por otra parte, el 16,5% de pacientes infectados por variantes no-B estaban relacionados, un valor similar al encontrado en cohortes no-B holandesas, británicas o suizas (Hughes *et al.*, 2009; Chalmet *et al.*, 2010; von Wyl *et al.*, 2011). El menor nivel de agrupamiento epidemiológico con respecto a otros estudios podría indicar que las sub-epidemias de tanto subtipo B como variantes no-B en Madrid están mantenidas por un aporte e intercambio de pacientes de otras regiones, o por una introducción constante de virus desde otros países. Esto que concuerda con el hecho de que la Comunidad de Madrid es un área con alta inmigración y movimientos poblacionales (Caro-Murillo *et al.*, 2010).

No obstante, encontramos diferentes dinámicas de transmisión dentro de las distintas variantes no-B. Los resultados presentados para el CRF02_AG sugieren que, a pesar de ser la variante no-B más frecuente en España, su presencia se debe

a introducciones múltiples a través de individuos que no están propagando activamente el virus en Madrid. Esto podría ser una consecuencia de la habitualmente intermitente llegada a Madrid de pacientes infectados por VIH desde África occidental y central, especialmente desde la antigua colonia española de Guinea Ecuatorial, donde este recombinante es mayoritario (Djoko *et al.*, 2010). Al contrario, los pacientes infectados por recombinantes BF y BG, a pesar de la menor prevalencia de éstos en la población, mostraron una mayor proporción de agrupamiento y un mayor tamaño de cluster que la media de la cohorte. Los clusters de BF y BG incluyeron exclusivamente pacientes españoles y latinoamericanos, y tanto HSH como heterosexuales. Dado que el tamaño de los clusters está correlacionado con su expansión en el tiempo (Brenner *et al.*, 2011), se podría esperar un aumento en la prevalencia de estas dos familias recombinantes en España en los próximos años, probablemente entre población autóctona. De hecho, el 45,4% de todos los clusters no-B (78,8% en los clusters BF o BG) incluían al menos un paciente español, lo que indica que muchas de estas transmisiones no-B probablemente han tenido lugar en nuestro país.

Se encontraron pocas cadenas de transmisión que pudieran suponer una fuente potencial de virus portador de resistencias independiente del tratamiento, en concordancia con la incidencia en descenso de las MRT en la epidemia general en España comentada en el **Capítulo 2** de esta Tesis. Sin embargo, uno de estos grupos de transmisión estaba formado por 3 pacientes HSH *naive* e infectados por virus portadores de la mutación K103N en la TI. Esta sustitución compromete seriamente el uso de efavirenz, el fármaco recomendado como tercer ARV dentro de la pauta del TARGA por las guías españolas (GeSIDA, 2012). Además, encontramos una menor prevalencia de mutaciones de resistencia en los pacientes incluidos en cadenas de transmisión que en los no incluidos, lo que concuerda con el hecho de que un virus con mutaciones de resistencia presenta, en principio, una desventaja biológica frente al virus silvestre que disminuye la eficacia de su transmisión (Leigh Brown *et al.*, 2003).

En toda reconstrucción de la transmisión se asume que no todos los eventos de transmisión se detectan y que no todos los miembros del cluster se han muestreado, lo que causa: a) una sobrestimación del tiempo transcurrido entre dos

eventos de transmisión; y b) una subestimación tanto del tamaño de la cadena de transmisión (y por tanto del número de transmisiones) como de la proporción de pacientes relacionados epidemiológicamente entre sí. Este muestreo incompleto afectaría especialmente a las infecciones importadas (frecuentemente causadas por variantes no-B), dado que la probabilidad de incluir en el muestreo a miembros de esa cadena de transmisión es muy baja. En estos casos, quedarían sin detectar fenómenos de transmisión que tuvieron lugar en los países de origen de los pacientes. Además, entre las transmisiones de no-B que sí se detectan, siempre existe cierta incertidumbre sobre dónde tuvo lugar esa transmisión. La cobertura del muestreo también influye claramente en esta selección parcial de secuencias, y depende de los objetivos del estudio y la estrategia de recolección. Por consiguiente, los estudios de vigilancia basados en una ciudad única o en áreas muy específicas tienen más oportunidades de incluir un muestreo casi completo de la población infectada por VIH y, por lo tanto, sus resultados son más cercanos a la situación real (Fisher *et al.*, 2010). Por el contrario, los estudios enfocados en ciudades más grandes y/o en países enteros, a pesar de la inclusión de un mayor número de muestras y de ofrecer una visión más global, sufren inevitablemente un muestreo más parcial e incompleto de la población infectada (Lewis *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2009; Chalmet *et al.*, 2010; Kouyos *et al.*, 2010; Brenner *et al.*, 2011). Este trabajo incluye muestras de 4 hospitales o clínicas diferentes de Madrid, y su número de muestras incluye, aproximadamente, un quinto de todos los nuevos diagnósticos de VIH de la región en los últimos 15 años. Sin embargo, debido a la atención especial que estos hospitales dan a la población subsahariana, el estudio presenta una sobrerrepresentación de este colectivo y, por consiguiente, de variantes no-B y de pacientes infectados por transmisión heterosexual del virus comparado con lo observado en la epidemia general de VIH en España (SINIVIH, 2011).

En resumen, la inclusión en redes de transmisión del VIH-1 en Madrid fue más probable para infectados que fueran hombres, infectados mediante relaciones homo/bisexuales de riesgo y con origen español o latinoamericano. La ausencia de grandes cadenas de transmisión en esta cohorte sugiere una epidemia de no-B que no es autosuficiente sino mantenida por introducciones constantes. La excepción a

este hecho encontrada en los recombinantes BF y BG refuerza la idea de que la transmisión en nuestro país de distintas variantes virales depende del perfil de los pacientes a los que se asocian, en este caso a población procedente de Latinoamérica. De hecho, al contrario que el resto de Europa occidental, por su similitud lingüística y cultural, España recibe una gran cantidad de inmigración desde Latinoamérica, donde estos recombinantes se originaron.

Este trabajo acentúa que los métodos filogenéticos son herramientas muy valiosas y poderosas que pueden ser utilizadas para estudios de epidemiología molecular del virus. En combinación con la vigilancia epidemiológica tradicional, pueden aportar información sobre los patrones de transmisión del VIH, un conocimiento que es esencial para el diseño de campañas de prevención enfocadas en colectivos de nuestro entorno que son especialmente vulnerables en la lucha contra el VIH/sida, como los HSH o los inmigrantes.

CAPÍTULO 4

Influencia de la presencia de variantes no-B en herramientas informáticas de uso clínico

ANTECEDENTES

Como se ha visto hasta ahora, la inmigración desde regiones con alta prevalencia del VIH y en las que circulan múltiples cepas del virus ha permitido la introducción en los países de acogida de variantes del virus anteriormente muy poco frecuentes. Sin embargo, en la actualidad la llegada y diseminación de variantes no-B del VIH-1 se produce tanto en población inmigrante como en nativa. En este capítulo se evalúa el impacto de la presencia creciente de diferentes variantes del virus en algunas herramientas informáticas de amplio uso en la rutina clínica pero que fueron diseñadas en los países desarrollados cuando la epidemia del VIH estaba monopolizada por el subtipo B del virus.

En primer lugar, en el **Capítulo 2** se comentó la importancia que la presencia de mutaciones de resistencia en pacientes que nunca han recibido tratamiento tiene en la respuesta al TARGA de inicio. Por ello, las guías internacionales de manejo clínico del VIH recomiendan la realización rutinaria de un ensayo de detección de mutaciones de resistencia a ARV previo a la elección del primer TARGA para que éste resulte óptimo (Hirsch *et al.*, 2008; Vandamme *et al.*, 2011; GeSIDA, 2012). Las variantes resistentes pueden detectarse mediante técnicas genotípicas o fenotípicas. Las genotípicas detectan los cambios específicos o mutaciones en las secuencias genéticas codificantes de las enzimas diana de los fármacos (TI, PR, integrasa, envoltura viral), mientras que las fenotípicas determinan la respuesta de la población viral mayoritaria a concentraciones crecientes de cada fármaco. Ambas comparten limitaciones como la dificultad de detección cuando la variante portadora de la mutación es minoritaria (inferior al 20% de la población viral total) o cuando la carga viral es baja (GeSIDA, 2012).

Los ensayos genotípicos son más utilizados que los fenotípicos, debido a su menor coste, mayor facilidad de implementación y mayor rapidez en la obtención de resultados. Además, permiten la detección de mutaciones de resistencia antes de que se detecten cambios fenotípicos en la susceptibilidad. Su mayor limitación radica en la dificultad de establecer una correlación genotipo-fenotipo y, sobre todo, en las dificultades de interpretación para algunos fármacos. Además, su aplicación requiere el conocimiento previo de la influencia que tiene cada

mutación en la eficacia de cada fármaco. Para solventar este punto, se han ido desarrollando algoritmos que correlacionan los patrones genotípicos encontrados en las secuencias virales con los datos fenotípicos y clínicos disponibles. Estos algoritmos son baratos, algunos de ellos incluso disponibles gratuitamente en internet, y por lo tanto son muy utilizados para la detección e interpretación de mutaciones de resistencia utilizando secuencias *pol* obtenidas de forma rutinaria en los hospitales para este propósito. Sin embargo, estas herramientas fueron elaboradas basándose en los resultados derivados de experimentos y ensayos clínicos con el subtipo B del VIH-1. Como ya se ha comentado, esta es la variante prevalente en los países desarrollados donde se dispone de todos los ARV. Por su parte, los subtipos no-B y recombinantes son tradicionalmente ignorados en estos ensayos, a pesar de suponer el 88% de las infecciones por VIH-1 a nivel mundial.

Estas variantes no-B presentan polimorfismos (sustituciones detectadas en más del 10% de las muestras obtenidas de pacientes *naïve*) específicos de cada cepa, e incluso aminoácidos silvestres diferentes a los del subtipo B en posiciones relacionadas con resistencia a fármacos (Kantor y Katzenstein, 2003). Estas diferencias con el subtipo B pueden ser malinterpretadas por los algoritmos. Además, las mutaciones consideradas como predictoras de resistencia varían de un algoritmo a otro (Champenois *et al.*, 2008), lo que complica la comparación de la resistencia genotípica entre ellos especialmente cuando se estudian las variantes no-B. La influencia de estos patrones específicos de cada cepa en la respuesta al tratamiento a largo plazo no se conoce aún con detalle, por lo que es importante estudiar su papel en las discordancias entre algoritmos. En este capítulo comparamos la interpretación genotípica de resistencia según cinco algoritmos distintos al analizar un panel de secuencias *pol* con alta representación de variantes no-B del VIH-1.

Por otra parte, existen otras aplicaciones informáticas disponibles en internet como son las herramientas automatizadas de subtipaje rápido del VIH. El análisis filogenético (AF) de secuencias del VIH-1 es el método de referencia para su clasificación en subtipos y/o recombinantes CRF. Sin embargo, debido a su complejidad y a su requerimiento de personal formado no está implementado en la rutina diaria. Por ello, muchos profesionales de la salud utilizan herramientas

automatizadas de subtipaje. Éstas son páginas web en las que se introducen las secuencias del VIH-1 generadas para el estudio genético de resistencias y que asignan un determinado subtipo o recombinante por similitud con determinadas secuencias de referencia. Estas herramientas, como los algoritmos de resistencia comentados antes, son rápidas, fáciles de usar y, en su mayoría, gratuitas. Pueden ser útiles para la identificación del subtipo B y ciertas variantes no-B, pero tienen importantes limitaciones especialmente en el caso de los recombinantes, que con algunas herramientas incluso son asignados al subtipo B, subestimando de esta forma la presencia de variantes complejas del virus (Smith *et al.*, 2005; Holguín *et al.*, 2008c; Ntemgwa *et al.*, 2008; Wilkinson y Engelbrecht, 2009). Además, los resultados de las distintas herramientas suelen ser discordantes (Gifford *et al.*, 2006; Loveday y MacRae, 2006). En este apartado se revisan los trabajos que evalúan la eficacia de las herramientas automatizadas de subtipaje del VIH-1, y a su vez se analiza la sensibilidad y especificidad de siete de estas herramientas al analizar el panel de secuencias *pol* cedido por la cohorte nacional de personas con infección por VIH de la Red de Investigación en Sida (CoRIS), representativa de las variantes virales que circulan en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Comparación entre los algoritmos de interpretación genotípica de resistencias a ARV

Para evaluar la concordancia entre estos algoritmos se recopiló un panel de secuencias *pol* del VIH-1 con alta y variada representación de variantes no-B obtenidas a partir de plasma de 354 pacientes sin exposición previa a la terapia ARV según los informes clínicos. Los pacientes habían sido diagnosticados desde 1999 a 2007 en 4 clínicas de VIH/sida en España: Centro Sanitario Sandoval de Madrid (210 pacientes), Hospital Carlos III de Madrid (130 pacientes), Hospital de Móstoles (5 pacientes), Hospital Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria (5 pacientes). Por último, 4 pacientes fueron atendidos en las instalaciones de la ONG Medicus Mundi en Madrid. Según su lugar de nacimiento, los pacientes eran españoles (45,8%), latinoamericanos (20,6%), africanos (18,6%), otros europeos (5,9%), asiáticos (0,3%) y el resto (8,8%) tenían origen desconocido. De los 354 casos, según AF previos, 226 pertenecían al subtipo B del VIH-1 y 128 eran

variantes no-B: 41 subtipos no-B puros (9 A, 8 C, 1 D, 8 F, 15 G) y 87 recombinantes (41 CRF02_AG, 5 CRF06_cpx, 3 CRF10_CD, 2 CRF11_cpx, 16 CRF12_BF, 1 CRF13_cpx, 9 CRF14_BG, 1 CRF19_cpx, 1 CRF22_01A1, 6 CRF23_BG y 2 CRF31_BC). Se disponía de la secuencia de PR y TI en 318 casos, y en el resto sólo el gen de la PR estaba disponible. Se estudió la variabilidad, según el subtipo viral, en las posiciones asociadas a resistencia a fármacos según la lista de la IAS-USA de 2008.

Se estudió la concordancia entre cinco algoritmos de resistencia genotípica (enlaces en **Anexo I**):

- ANRS versión 2008.07 (Agencia Nacional de Investigación del Sida francesa).
- Stanford HIVdb versión 4.3.7 (Universidad de Stanford, EE. UU.).
- Rega versión 7.1.1 (Universidad de Leuven, Bélgica).
- Geno2pheno versión 3.0 (Instituto Max Planck de Informática, Alemania).
- RIS versión 2008 (Red de Investigación en Sida, España).

Cada algoritmo clasificó cada secuencia en diferentes niveles de resistencia a cada fármaco. Para comparar estos resultados, se normalizaron los niveles de resistencia en tres: sensible (S), con resistencia intermedia (I) y con resistencia alta (R), siguiendo el ejemplo del programa HIValg de la Universidad de Stanford. La comparación de las interpretaciones se consideró como “concordante” cuando todos los algoritmos asignaron el mismo nivel de resistencia (S, I o R) a una determinada secuencia para un determinado fármaco. Por otra parte, se consideró “discordancia total” cuando un algoritmo determinó una muestra dada como S para un fármaco y otro algoritmo la consideró como R para ese mismo fármaco. Por último, una “discordancia parcial” fue aquella en la que un algoritmo determinó una muestra específica como S para un fármaco particular y otro algoritmo la determinó como I; o bien cuando un algoritmo determinó como I una secuencia y otro la determinó como R.

b) Evaluación de herramientas automatizadas de subtipaje del VIH-1

Para este estudio se utilizó el panel de 670 secuencias *pol* de la cohorte nacional de personas con infección por VIH de la Red de Investigación en Sida (CoRIS). Ésta es una cohorte representativa y multicéntrica, que incluye pacientes *naïve* mayores

de 13 años atendidos en 31 hospitales de 19 comunidades autónomas desde 2004. El 30% de estos pacientes eran inmigrantes (Caro-Murillo *et al.*, 2007). De los 670 pacientes incluidos, el 70% eran españoles, 19,3% latinoamericanos, 2,5% de otros países de la UE, 2,5% africanos subsaharianos, 2,3% norteafricanos, 1,8% de Europa del este y 1,5% de otras regiones o de origen desconocido. Las 670 secuencias *pol* basales incluían el gen completo de la PR y parte del gen de la TI (codones 38-260 o 1-335 según la técnica utilizada en cada hospital). Entre las secuencias de CoRIS, mediante AF se estimó que 587 (87.6%) eran de subtipo B, y 83 (12,4%) eran variantes no-B. De estas últimas, 13 (15,7%) eran subtipos no-B puros (1 A1, 3 C, 4 F1, 4 F2, 1 G) y las otras 70 (84,3%) eran formas recombinantes: 1 CRF01_AE, 31 CRF02_AG, 2 CRF03_AB, 1 CRF06_cpx, 1 CRF11_cpx, 1 CRF12_BF, 4 CRF14_BG, 1 CRF15_01B, 2 CRF19_cpx, 1 CRF20_BG, 1 CRF28_BF, 1 CRF42_BF y 23 URF.

Además del análisis filogenético previo, se realizó también el subtipaje de las secuencias VIH mediante 7 herramientas automatizadas para comparar sus resultados con la filogenia (método de referencia). Las 6 primeras de ellas eran gratuitas y disponibles en internet, mientras que la última era una herramienta comercial (enlaces en **Anexo I**):

- Stanford HIVdb versión 6.0.5 (Universidad de Stanford, EE. UU.).
- Rega Subtyping Tool versión 2.0 (Universidad de Leuven, Bélgica).
- Geno2pheno versión 3.0 (Instituto Max Planck de Informática, Alemania).
- NCBI Genotyping Tool versiones 2005 y 2009 (National Center for Biotechnology Information, EE. UU.).
- EuResist Prediction System versión 2009 (Red Europea EuResist).
- STAR versión 2006 (University College de Londres, Reino Unido).
- TherapyEdge versión 2009 (TherapyEdge-HIV, ABL, Luxemburgo).

Se definió la sensibilidad como la capacidad de cada herramienta para clasificar correctamente cada una de las secuencias perteneciente a una variante, es decir, el porcentaje de secuencias de un subtipo clasificadas correctamente. Y la especificidad, como la capacidad de cada herramienta para no asignar una variante a las secuencias que no pertenecen a esa cepa, es decir, el porcentaje de secuencias asignadas a un subtipo y que pertenecen realmente a él.

Análisis estadístico

Para la comparación en los resultados de los algoritmos de interpretación de resistencias se realizó una prueba chi cuadrado utilizando el programa SPSS versión 15 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). Se estableció el límite de significación en 0,05 para los valores *P*. La sensibilidad y especificidad de las herramientas de subtipaje se obtuvieron con una calculadora creada por la Unidad de Bioestadística Clínica del Hospital Ramón y Cajal y disponible en internet (**Anexo I**).

RESULTADOS

a) Discrepancias entre 5 algoritmos de interpretación de resistencia

En la **Figura 4.1** se muestra la variabilidad de las secuencias en los aminoácidos relacionados con resistencia a ARV según el subtipo, con el fin de evaluar las diferencias genéticas entre el subtipo B (*n*=226) y las variantes no-B (*n*=128). De esta forma se pudo comprobar que las mutaciones principales a IP más frecuentes fueron, en no-B, M46L (3,1%) y V82A (3,1%), mientras que en el subtipo B fueron M46I/L (3,1%) y L90M (1,8%). Para la resistencia a ITIAN, las mutaciones M184V (1,8%) y M41L (1,9%) fueron las más comunes en variantes no-B y B, respectivamente. Las mutaciones de resistencia a ITINAN más frecuentes fueron V90I y K103N (5,6% cada una) en no-B y la K103N (4,3%) en el subtipo B.

El aspecto más interesante fue la presencia natural (no producida por exposición a fármacos ARV) de mutaciones de resistencia a IP secundarias. La mayoría (100% en variantes no-B, 93% en subtipo B) de las 354 secuencias de PR tenían alguna mutación de esta categoría, diferentes en frecuencia y naturaleza según las variantes dado que algunas de estas sustituciones eran en realidad el aminoácido silvestre en determinados subtipos o recombinantes. Esto explicaría la frecuencia distinta de aminoácidos relacionados con resistencia secundaria en algunas posiciones en secuencias de subtipo B frente a no-B (**Tabla 4.1**).

Figura 4.1: Sustituciones en la PR (A) y la TI (B) asociadas con resistencia a fármacos ARV según la variante del VIH-1.

A.		Mutaciones principales a IP															Mutaciones secundarias a IP														
		V92I	I33P	M46I/L	Q58E	I50V/V	V82A/T/E/S/L	I59M	V11I	I13V	G16E	K20R/M/T/R/V	L24I	L33I/V	E34Q	E35G	M36I/L/V	K43P	E53L/Y	T54V/T/A/S	D60E	L62V	L63P	T64L/M/V	H69K	A71V/I/E/L	V77I	V82I	I93L/M		
Variantes		-	-	1	-	-	-	3	-	7	2	3	-	1	-	-	8	-	-	-	-	-	-	2	9	-	-	-	1		
B (226)		-	1	3	-	1	3	4	25	-	42	1	8	1	11	-	38	1	4	3	5	49	119	59	1	36	74	1	80		
C (8)		-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	1	-	-	-	7	-	-	-	-	-	3	-	8	-	1	-	6		
D (1)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-		
F (8)		-	-	-	-	-	-	3	-	1	2	3	-	-	-	-	6	-	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	-		
G (15)		-	-	-	-	-	-	2	-	13	1	15	-	-	-	-	15	-	-	-	-	1	4	1	15	-	2	12	1		
CRF02 (41)		-	1	1	-	-	-	8	-	33	6	38	-	-	1	1	38	-	-	-	-	1	4	5	40	-	1	1	1		
CRF06 (5)		-	-	-	-	-	-	-	-	5	1	5	-	-	-	-	5	-	-	-	-	1	-	3	4	-	-	-	-		
CRF10 (3)		1	-	1	-	1	1	-	-	2	1	-	-	-	-	-	3	-	-	-	1	1	1	2	-	-	-	-	-		
CRF11 (2)		-	-	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	2	-	1	-	-	-		
CRF12 (16)		-	-	-	3	-	3	5	-	3	3	5	-	-	-	-	16	-	-	3	-	1	-	1	2	-	-	-	4		
CRF13 (1)		-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-		
CRF14 (9)		-	-	1	-	-	-	1	-	9	-	9	-	-	-	-	9	-	-	-	1	-	-	-	9	-	9	-	-		
CRF19 (1)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CRF22 (1)		-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-		
CRF23 (6)		-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	3	6	-	-	6	1		
CRF31 (2)		-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	1		
No-B (128)		0,8	0,8	3,1	2,3	0	3,1	0,8	19	0,8	66	14	69	0	0,8	0,8	93	0	0	2,3	2,3	5,5	13	13	79	0	5,5	22	12		
B (226)		0	0,4	1,3	0	0,4	1,3	1,8	11	0	19	0,4	3,5	0,4	4,9	0	17	0,4	1,8	1,3	2,2	22	53	26	0,4	16	33	0,4	35		
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

(continúa)

Figura 4.1 (continuación).

B.	Resistencia a ITIAN												Resistencia a ITINAN							
Variantes	M41L	A62V	K65R	D67N	K70R/E	L74V	F77L	M184V/I	L210W	F215Y/E	F215rev	K219Q/E	V90I	K101E/P	K103N	V106M/A/I	V179D/E/T	Y181C/I/V	G190S/A	P225H
A (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-
B (210)	4	3	1	3	2	1	-	1	3	1	2	2	1	1	9	-	4	1	-	-
C (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F (7)	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
G (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRF02 (38)	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	6	1	1	1	-	1	1	1
CRF06 (3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRF10 (3)	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
CRF11 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRF12 (16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
CRF14 (8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRF23 (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-
CRF31 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No-B (108)	0,9	0	0	0,9	0	0,9	0,9	1,8	0,9	0	1,8	0,9	5,6	0,9	5,6	3,7	0	0,9	1,8	0,9
B (210)	1,9	1,4	0,5	1,4	0,9	0,5	-	0,5	1,4	0,5	2,9	0,9	0,5	0,5	4,3	-	1,9	0,5	-	-

*

-, sin cambios con respecto a HXB2. En negrilla y azul, aminoácidos silvestres en esa variante. El asterisco indica diferencias significativas en la prueba chi cuadrado al comparar la prevalencia de cambios en subtipo B frente a formas no-B. No se muestran las mutaciones ausentes en todas las variantes: en la PR, D30N, I47V/A, G48V, I54M/L, T74P, L76V, I84V y N88S; y en la TI, T69ins, V75I, A98G, L100I, V108I, Y115F, F116Y, E138A, Q151M, Y188C/L/H y M230L.

Tabla 4.1: Sustituciones en posiciones de resistencia secundaria a IP con frecuencia significativamente diferente en subtipo B y formas no-B del VIH-1.

Mutaciones en PR	Frecuencia (%)		Fármacos IP afectados
	No-B	B	
L10V/I/R/F/C	19	11	ATZ/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r
I13V	66	19	TPV/r
G16E	14	0,4	ATV/r
K20R/M/I/T/V	69	3,5	ATV/r, IDV/r, LPV/r
M36I/L/V	93	17	ATV/r, IDV/r, NFV, TPV/r
H69K	79	0,4	TPV/r
V82I	22	0,4	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r
L33I/V	0,8	4,9	ATV/r, DRV/r, LPV/r, TPV/r
I62V	5,5	22	ATV/r, SQV/r
L63P	13	53	LPV/r
I64L/M/V	13	26	ATV/r
A71V/I/T/L	0	16	ATV/r
V77I	5,5	33	IDV/r, NFV, SQV/r
I93L/M	12	35	ATV/r

Se indican los fármacos ARV afectados según la lista de la IAS-USA.

En cuanto a la interpretación de resistencias genotípicas, se analizó la predicción a 18 fármacos (8 IP, 7 ITIAN y 3 ITINAN) para las 354 secuencias *pol* usando cinco algoritmos diferentes. Estas interpretaciones están reflejadas en la **Tabla 4.2**. La mayoría de las muestras fueron consideradas como sensibles (S) a todos los ARV por parte de todos los algoritmos, excepto en el caso de la resistencia a tipranavir según el algoritmo ANRS al analizar las secuencias *pol* de las variantes no-B del VIH-1. Por este motivo el tipranavir fue excluido de las comparaciones que incluían a la familia de los IP y sus discrepancias particulares serán analizadas más adelante. Por otro lado, del 4 al 8% de las secuencias, todas de pacientes *naïve*, presentaban resistencia intermedia (I) o alta (R) para algún fármaco. El algoritmo ANRS clasificó como I o R un número significativamente mayor de secuencias no-B que del subtipo B para las familias de IP (90,6% y 7,5%; $P<0,05$) e ITINAN (18,5% y 4,3%; $P<0,05$). Para los otros algoritmos, sólo el 6-7% y el 8% de las secuencias no-B tenían alguna resistencia (I o R) a las familias de IP o ITINAN, respectivamente. El algoritmo HIVdb de Stanford fue el que clasificó el menor número de secuencias como R para los fármacos IP. Por último, Geno2pheno clasificó como I o R (es decir, con algún nivel de resistencia) a los ITIAN un número significativamente mayor de secuencias que el resto de algoritmos, tanto de subtipo B como no-B (20% para Geno2pheno y 5-7% según el algoritmo; $P<0,05$ en cualquier comparación).

Al analizar las discrepancias entre algoritmos (**Tabla 4.3**), se encontraron más discordancias (totales y parciales) al analizar variantes no-B que al analizar secuencias de subtipo B para los fármacos ITINAN (13% y 2,9%; $P<0,05$). Sin embargo, el nivel de discordancias era parecido en no-B y B en el caso de los ITIAN (16,7% y 14,8%; $P=NS$) y los IP excluyendo el caso de tipranavir (8,6% y 5,7%; $P=NS$). Dejando de lado el subtipo y considerando únicamente las familias de fármacos, las discordancias (totales y parciales) entre algoritmos fueron significativamente más frecuentes para ITIAN (15,4%) que para ITINAN (6%) o IP (6%) excluyendo los resultados para el tipranavir ($P<0,01$). Al considerar solo discordancias totales, el nivel de discrepancia entre los algoritmos era similar en las tres familias de ARV (4,4%, 5% y 4,2%, respectivamente).

Tabla 4.2: Porcentaje de secuencias asignadas a cada nivel de resistencia según el algoritmo y la familia de ARV para variantes B y no-B del VIH-1.

Familia ARV	Variantes VIH-1 (n°)	Algoritmos de resistencia genotípica (% de secuencias asignadas a cada nivel de resistencia)														
		ANRS			Stanford			Rega			Geno2pheno			RIS		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
IP	No-B (128)	9,4	14,8	75,8	94,4	5,5	0,8	94,4	3,1	3,1	94,4	3,1	3,1	94,4	3,1	3,1
	B (226)	92,5	2,6	4,9	94,7	4,9	0,4	95,6	2,6	1,8	95,6	2,2	2,2	96	3,1	0,9
ITIAN	No-B (108)	95,4	1,8	2,8	92,6	4,6	2,8	94,4	2,8	2,8	78,7	14,8	6,5	95,4	1,8	2,8
	B (210)	93,8	2,4	3,8	93,3	5,2	1,4	93,3	3,8	2,9	81	16,7	2,4	93,8	3,8	2,4
ITINAN	No-B (108)	81,5	0	18,5	91,7	0,9	7,4	91,7	0,9	7,4	91,7	0	8,3	92,6	0	7,4
	B (210)	95,7	0	4,3	94,3	1,4	4,3	95,7	0	4,3	94,8	0	5,2	95,2	0	4,8

S, secuencias interpretadas como susceptibles por el respectivo algoritmo para una familia antirretroviral; I, resistencia intermedia; R, resistencia alta. No-B incluyen todos aquellos subtipos distintos del B así como todas las formas recombinantes.

Tabla 4.3: Tasa de discordancias entre los cinco algoritmos de interpretación de resistencia genotípica en variantes B y no-B del VIH-1.

Fármacos ARV	Discordancias totales			Discordancias parciales			Concordancias no-B / B
	No-B / B (%)	P	Discordantes	No-B / B (%)	P	Discordantes	
Cualquier IP	76,6 / 4,4	<0,01	99 no-B, 17B	10,9 / 6,6	NS		22,3 / 92,5
Atazanavir	2,3 / 1,3	NS		2,3 / 2,6	NS		95,3 / 96,0
Darunavir	0 / 0	-		0,8 / 0,9	NS		99,2 / 99,1
Fosamprenavir	3,1 / 0,4	0,04	3CRF12, 1CRF10, 1B	0 / 2,2	NS		96,9 / 97,3
Indinavir	2,3 / 1,8	NS		3,1 / 1,3	NS		94,5 / 96,0
Lopinavir	2,3 / 1,3	NS		0,8 / 0,9	NS		96,9 / 97,8
Saquinavir	0 / 0	-		4,7 / 3,1	NS		95,3 / 96,9
Nelfinavir	0 / 0,4	NS		6,2 / 3,5	NS		94,5 / 96,0
Tipranavir	73,4 / 0,9	<0,01	94 no-B, 2B	10,9 / 1,8	<0,01	14 no-B, 4B	12,5 / 97,3
Cualquier ITIAN	5,6 / 3,8	NS		16,7 / 13,8	NS		83,3 / 85,2
Lamivudina	0,9 / 0	NS		0,9 / 1,9	NS		98,1 / 98,1
Abacavir	0,9 / 0,4	NS		2,8 / 2,9	NS		95,4 / 96,7
Zidovudina	0,9 / 0,9	NS		1,8 / 4,3	NS		97,2 / 94,8
Estavudina	0 / 0,9	NS		9,3 / 12,6	NS		90,7 / 86,2
Didanosina	6,5 / 1,9	0,03	4CRF02, 1A, 1CRF10, 1CRF14, 4B	6,5 / 3,8	NS		87,0 / 94,3
Emtricitabina	0 / 0	-		0,9 / 1,4	NS		99,1 / 98,6
Tenofovir	0,9 / 1,4	NS		1,8 / 7,6	0,03	16B, 1A, 1CRF10	97,2 / 90,9
Cualquier ITINAN	11,1 / 1,9	<0,01	8CRF14, 2CRF23, 1C, 1CRF10, 4B	0,9 / 0,9	NS		87,0 / 97,1
Efavirenz	0,9 / 0	NS		0 / 0	-		99,1 / 100
Etravirina	0 / 0,5	NS		0,9 / 0,5	NS		99,1 / 99,0
Nevirapina	11 / 1,4	<0,01	8CRF14, 2C, 2CRF23, 3B	0 / 0,5	NS		88,9 / 98,1
Cualquier ITI	15,7 / 5,7	<0,01	8CRF14, 4CRF02, 2C, 2CRF23, 1A, 12B	17,6 / 14,8	NS		73,2 / 83,3

En negrilla, las diferencias significativas mediante la prueba chi cuadrado. NS, no significativo.

Considerando cada fármaco independientemente, hubo significativamente mayor nivel de discordancias totales al analizar variantes no-B que para subtipo B en los casos de tipranavir (73,4% y 0,9%; $P<0,05$), fosamprenavir (3,1% y 0,4%; $P<0,05$), nevirapina (11% y 1,4%; $P<0,05$) y didanosina (6,5% y 1,9%; $P<0,05$). Sin embargo, en el caso del tenofovir hubo más discrepancias parciales al analizar el subtipo B que las variantes no-B (8,6% y 1,8%; $P<0,05$).

Las secuencias que contenían cambios en las posiciones M36, H69 y L89 de la PR (el 75,8% de los virus no-B incluidos en este estudio) fueron clasificadas como R para tipranavir según el algoritmo ANRS y como I a este fármaco cuando contenían dos de estos tres cambios. También para ANRS, todas las secuencias no-B fueron susceptibles a didanosina ya que este algoritmo, al contrario que el resto de herramientas, no incluía la mutación L74V de la TI como indicadora de resistencia a didanosina. Geno2pheno consideró a las secuencias con la mutación I135T de la TI, en combinación con V60I o T200A, como I a tenofovir, a pesar de que ninguna de las dos últimas estaba registradas en la lista consenso de la IAS-USA como relacionadas con resistencia.

ANRS interpretó un alto número de secuencias no-B del VIH-1 como resistentes a nevirapina, debido a su consideración de la mutación A98S. De hecho este cambio es en realidad el residuo silvestre en el recombinante CRF14_BG (**Anexo I**) descrito por primera vez en España (Delgado *et al.*, 2002) y también un polimorfismo común en el CRF24_BG.

b) Sensibilidad de las herramientas de subtipaje automatizado

En la cohorte completa. La sensibilidad de las 7 herramientas comparadas con el AF varió según la variante del VIH-1 y la herramienta utilizada. Incluyendo las 670 secuencias *pol* de la cohorte CoRIS, con predominancia del subtipo B (87,6% de los casos), la sensibilidad superó el 90% para Geno2pheno, EuResist y TherapyEdge. Sin embargo, al analizar sólo las 83 secuencias no-B, estos mismos algoritmos más NCBI'05 sólo pudieron identificar correctamente el 55% de ellos (**Tabla 4.4**). El resto de herramientas, como mucho, identificaron la mitad. Es de destacar que un alto porcentaje de las 670 secuencias fueron no asignadas a ningún subtipo/CRF usando STAR y Rega (9,3% y 17,2%, respectivamente). En

concreto, STAR no clasificó 33 (40%) variantes no-B y 83 (14,1%) subtipos B, y Rega 32 (38,5%) no-B y 29 (4,9%) subtipos B. Stanford y TherapyEdge dieron los resultados de subtipo por separado para PR y TI, incluso cuando se usaron ambas regiones en un solo archivo. Stanford obtuvo sensibilidades muy parecidas para la clasificación de PR y TI, mientras que TherapyEdge clasificó algo mejor la TI que la PR (datos no mostrados).

Subtipos puros. Para la identificación del subtipo B ($n=587$), Stanford mostró la sensibilidad más alta (98,6%), fallando al clasificar sólo la PR de 6 subtipos B (**Tabla 4.4**). La especificidad en general también fue alta, variando del 84,3% (Geno2pheno) al 100% (Rega). Sin embargo, hubo fallos en algunas clasificaciones. De hecho, todas las herramientas exceptuando Rega y STAR señalaron como no-B algún porcentaje de secuencias B, del 1,4% de Stanford al 51,3% de NCBI'09. Esta última sobrestimó altamente la presencia de variantes no-B, dado que sólo pudo clasificar correctamente el 71,3% de los subtipos B con la versión de 2005 y el 48,7% con la de 2009. En los casos mal asignados, NCBI incluyó regiones del genoma pertenecientes a otros subtipos o CRF distintos del B, especialmente con la versión de 2009.

Para los subtipos no-B puros en *pol* ($n=13$), la tasa de subtipaje correcto fue también alta. EuResist y Geno2pheno clasificaron bien todas las secuencias. La sensibilidad fue de 77 a 92% en el resto de herramientas. La especificidad fue también alta (>99%) en la mayoría de los casos. Curiosamente, 19 de las 24 secuencias que Geno2pheno asignó mal fueron clasificadas como subtipo D. TherapyEdge clasificó erróneamente como no-B un 4,4% de los B, clasificándolos en 11 casos como D^{PR}/B^{TI} .

Formas recombinantes: CRF y URF. Todas las herramientas presentaron una alta sensibilidad en la detección de los recombinantes CRF01_AE y CRF02_AG (los mayoritarios en la pandemia) aunque del 7 al 29% de los CRF02_AG fueron subestimados según la herramienta. NCBI'09 presentó limitaciones importantes para detectar ambas variantes. La especificidad para estos dos recombinantes fue muy alta, desde el 98,4% de EuResist al 100% de NCBI'05 para CRF01_AE y del 99,7% de EuResist al 100% de Rega y NCBI'09 para CRF02_AG.

Tabla 4.4: Sensibilidad de las herramientas automatizadas de subtipaje respecto al análisis filogenético.

Variantes del VIH-1 (nº)	% Sensibilidad (95% IC)							
	Stanford	Rega	Geno2pheno	TherapyEdge	STAR	EuResist	NCBI'05	NCBI'09
Subtipo B (587)	98,6 (98-99)	85,9 (83-89)	95,9 (94-97)	95,6 (94-97)	95,1 (93-97)	97,6 (96-99)	81,3 (78-84)	48,7 (45-53)
Variantes no-B (83)	47 (36-58)	48,2 (37-59)	59 (48-70)	55,4 (45-66)	50,6 (40-61)	57,8 (47-68)	54,2 (43-65)	16,9 (9-53)
Subtipos no-B puros (13)	76,9 (54-100)	92,3 (78-100)	100	92,3 (78-100)	84,6 (65-100)	100	76,9 (54-100)	53,8 (27-81)
CRF02_AG (31)	90,3 (80-100)	71 (55-87)	93,5 (85-100)	83,9 (71-97)	83,9 (71-97)	87,1 (75-99)	77,4 (63-92)	9,7 (-1-20)
CRF no-02_AG (16)	6,2 (-6-18)	12,5 (-4-29)	43,5 (19-68)	50 (25-74)	6,2 (-6-18)	50 (25-74)	31,2 (8-54)	25 (4-46)
URF (23)	0	17,4 (2-33)	0	0	17,4 (2-33)	0	26,1 (8-44)	0
Total (670)	77,3 (74-80)	81,2 (78-84)	91,3 (89-93)	90,6 (88-93)	89,5 (87-92)	92,7 (91-95)	77,9 (75-81)	44,8 (41-48)

Se consideró una clasificación como correcta cuando la herramienta asignó el mismo subtipo/CRF que el análisis filogenético.

Sin embargo, la eficacia de todas las herramientas descendió claramente al identificar al resto de los recombinantes (**Tabla 4.5**). Las herramientas fueron incapaces de detectar la mayoría de las 15 secuencias pertenecientes a 10 CRF diferentes al CRF01_AE y CRF02_AG, aunque EuResist, TherapyEdge y Geno2pheno dieron los mejores resultados. Con respecto a la identificación de recombinantes complejos URF ($n=23$) previamente caracterizados mediante análisis filogenético y métodos de *bootscanning*, solo NCBI'05, Rega y STAR pudieron identificar mosaicos recombinantes, pero mostrando sensibilidades muy bajas. Rega mostró correctamente el patrón de recombinación en 4 casos: 2 URF_BF, 1 URF_BA y 1 URF_BC, STAR con otros 4: 3 URF_B02, 1 URF_BC. NCBI'05 fue la mejor herramienta al identificar 6 URF (3 URF_02B, 1 URF_03B, 1 URF_BG02 and 1 URF_BC). Como curiosidad, el URF_BC fue el único correctamente identificado por las 3 herramientas.

Tabla 4.5: Eficacia del subtipaje de los recombinantes del VIH-1 según las 7 herramientas automatizadas comparadas.

Recombinantes (nº)	Identificaciones correctas (nº) según cada herramienta
CRF01_AE (1)	EuResist, Geno2pheno, NCBI'05, Rega, Stanford, STAR, y TherapyEdge (1)
CRF02_AG (31)	Geno2pheno (29); Stanford (28); EuResist (27); STAR y TherapyEge (26); NCBI'05 (24); Rega (22); NCBI'09 (3)
CRF03_AB (2)	Ninguna
CRF06_cpx (1)	EuResist, Geno2pheno y TherapyEdge (1)
CRF11_cpx (1)	TherapyEdge (1)
CRF12_BF (1)	Geno2pheno, NCBI'05, Rega y TherapyEdge (1)
CRF14_BG (4)	EuResist, Geno2pheno (4); NCBI'05, NCBI'09 y TherapyEdge (3)
CRF15_01B (1)	NCBI'05 (1)
CRF19_cpx (2)	EuResist (2); TherapyEdge (1)
CRF20_BG (1)	NCBI'09 (1)
CRF28_BF (1)	Ninguna
CRF42_BF (1)	Ninguna
URF (23)	NCBI'05 (6); Rega y STAR (4)

Variantes no-B identificadas como subtipo B. Como se muestra en la **Tabla 4.6**, con la excepción de NCBI'09 y Rega, una tasa considerable (del 1 al 16%) de las 83 variantes no-B del VIH-1 fueron incorrectamente clasificadas como subtipo B. Geno2pheno y EuResist presentaron la mayor sobrestimación de subtipos B, y NCBI y Rega la menor.

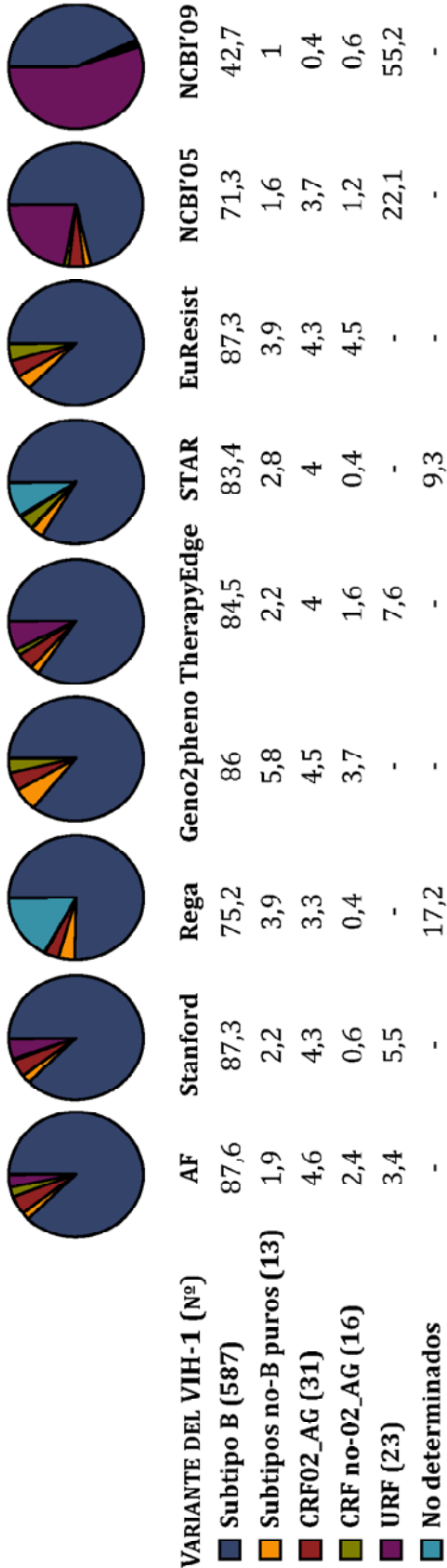
Tabla 4.6: Tasas de clasificación errónea del subtipo B y las variantes no-B del VIH-1 según las 7 herramientas automatizadas de subtipaje.

Herramienta	Falsos subtipos B (%)	Falsas variantes no-B (%)
Stanford (<i>pol</i>)	4,8	1,4
PR	15,7	1
TI	16,7	0,8
Rega	0	0
Geno2pheno	15,7	4,1
TherapyEdge (<i>pol</i>)	6	4,4
PR	10,4	4,4
TI	14,5	0,7
STAR	1,2	0
EuResist	14,5	2,4
NCBI '05	1,2	18,7
NCBI '09	0	51,3
Rango total	0-15,7	0-51,3

“Falsos subtipos B” y “Falsas variantes no-B” indican el porcentaje de verdaderas variantes no-B clasificadas como subtipo B y viceversa.

Distribución de las variantes del VIH-1 en CoRIS según la herramienta. En la **Figura 4.2** se muestra la distribución de subtipos y recombinantes en la cohorte según cada una de las herramientas. Para STAR y Rega, una alta tasa de secuencias (9 y 17%, respectivamente) fueron “no asignadas” a ningún subtipo o CRF. Las diferencias entre herramientas fueron especialmente pronunciadas para los CRF distintos del CRF02_AG: representaban el 2,4% según el AF, pero menos del 0,6% para STAR, Stanford y Rega, y 4,5% para EuResist. Finalmente, aunque los URF representaban realmente el 3,4% de CoRIS, esta estimación fue de 55,2% para NCBI'09 y de 22,1% para NCBI'05. Para TherapyEdge y Stanford, un resultado distinto en PR y TI fue considerado como URF (7,6% y 5,5% de los casos, respectivamente).

Figura 4.2: Distribución de las variantes del VIH-1 en la cohorte CoRIS empleando distintos métodos de subtipaje.



AF, análisis filogenético, la técnica de referencia para la clasificación de las variantes del VIH.

DISCUSIÓN

En la primera parte del estudio incluido en este Capítulo 4 se muestran las discordancias de cinco algoritmos de interpretación de resistencias al analizar un panel de 354 secuencias incluyendo diferentes variantes del VIH-1 (226 B, 128 no-B) aisladas en la Comunidad de Madrid. En la segunda parte, se comparan las sensibilidades de siete herramientas automatizadas de subtipaje del VIH-1 ampliamente utilizadas con respecto al análisis filogenético en las 670 muestras de la cohorte nacional CoRIS.

Interpretación de resistencia genotípica

Se observó una gran variabilidad genética entre las distintas variantes del VIH-1 (**Figura 4.1**), incluyendo la existencia de polimorfismos en posiciones relacionadas con resistencia a fármacos en diferente frecuencia y naturaleza según la variante. Algunos de estos polimorfismos son responsables de las discrepancias encontradas en la interpretación de resistencias usando diferentes algoritmos.

Estas discrepancias fueron significativamente más frecuentes al analizar variantes no-B que el subtipo B para los fármacos didanosina, nevirapina, tipranavir y fosamprenavir, y lo contrario para tenofovir. Estas discrepancias resaltan el hecho de que los patrones de mutaciones de resistencia no han sido totalmente dilucidados para las variantes no-B, especialmente para los fármacos IP. El uso de determinados algoritmos puede conducir a la sobrestimación de la resistencia cuando se analizan ciertas variantes no-B debido a la falta de consenso en las mutaciones consideradas como indicadoras de resistencia en PR y TI. Sin embargo, eso no significa que las herramientas utilizadas no sean útiles o que los algoritmos de interpretación no sean válidos para analizar formas no-B. Estos algoritmos son fáciles de usar y muy útiles en la práctica clínica durante el seguimiento de los pacientes infectados por VIH. Para la mayoría de variantes y fármacos se encontró una buena concordancia entre algoritmos. Sus discrepancias resaltan la necesidad de incluir más muestras de subtipos diferentes del B en las bases de datos de los algoritmos para así aumentar su utilidad, reduciendo así los errores en ciertas muestras no-B para algunos de los ARV. Esto evitaría interpretar como resistente una secuencia que presumiblemente no lo es.

Aunque otros trabajos habían descrito discrepancias entre algoritmos (Kijak *et al.*, 2003; Ravela *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2005; Snoeck *et al.*, 2006; Vergne *et al.*, 2006; Champenois *et al.*, 2008; Poonpiriya *et al.*, 2008), sólo algunos los comparaban utilizando diferentes variantes del VIH-1. De hecho, muy pocos incluían CRF mientras que en este trabajo se incluyeron 11 formas recombinantes. Por lo tanto, el estudio descrito en este **Capítulo** fue el que incluyó, hasta la fecha, el mayor número de variantes virales diferentes y el mayor número de algoritmos.

Uno de los trabajos (Champenois *et al.*, 2008) había correlacionado anteriormente la malinterpretación de la resistencia a tipranavir por el algoritmo de la ANRS, debida a la presencia de los M36I, H69K y L89M en la PR, que en realidad son los aminoácidos silvestres en la mayoría de las variantes no-B. El presente trabajo además describe que la sustitución A98S, que es el aminoácido silvestre en la TI del CRF14_BG y un polimorfismo muy frecuente en el subtipo G, fue interpretado como marcador de resistencia a nevirapina por este algoritmo.

Tras este estudio no se puede afirmar qué algoritmo es el más preciso. Para aclarar este aspecto se necesitarían ensayos fenotípicos que determinaran qué algoritmo está en lo cierto y cuál no. En todo caso, es recomendable el uso de varios algoritmos y así comparar sus resultados para evitar malinterpretaciones concretas. Específicamente, las mayores discordancias se encuentran en el análisis de secuencias *pol* no-B, por lo que es necesario que se realicen un mayor número de ensayos de susceptibilidad a ARV utilizando cepas no-B para que los algoritmos puedan incorporar sus resultados en las bases de datos en las que correlacionan patrones mutacionales concretos con la posible respuesta al tratamiento.

Subtipaje mediante herramientas automatizadas

Como se ha comentado antes, la correcta identificación de las variantes no-B del VIH-1 tiene importancia clínica. Para ello, el método de referencia es el análisis filogenético. Sin embargo, puede ser laborioso y complejo, por lo que se han desarrollado las herramientas automatizadas, útiles para clasificar el subtipo B pero con limitaciones para el resto de variantes. En este trabajo se muestra que la sensibilidad de ciertas herramientas al analizar secuencias de VIH obtenidas de grandes cohortes puede ser muy alta (especialmente para EuResist y Geno2pheno)

cuando el subtipo B es el predominante, como ocurre en CoRIS. Sin embargo, aún así se pudo ver alguna limitación para la identificación del subtipo B en algunas herramientas. La mayoría de éstas, en mayor o menor medida, encontraron falsos subtipos B entre las secuencias no-B, subestimando su prevalencia. Para la identificación correcta de subtipos no-B puros, las mejores herramientas fueron Geno2pheno y EuResist, con una sensibilidad del 100%.

Anteriores trabajos (revisados en la **Tabla 4.7**) habían descrito limitaciones específicas para no-B puros por parte de herramientas de subtipaje. Por ejemplo, el subtipo D suele ser subestimado con Rega (Gifford *et al.*, 2006; Holguín *et al.*, 2008c) pero sobrestimado con Geno2pheno, Stanford (Galán *et al.*, 2009) y TherapyEdge debido a su confusión con el subtipo B especialmente en la PR, como este estudio confirma. Una incorrecta clasificación del subtipo D tiene especial relevancia dado que esta variante parece presentar una progresión a sida más rápida y una mayor patogenicidad (Pant Pai *et al.*, 2012), por lo que es importante confirmar los casos asignados a este. También se ha publicado previamente una detección inadecuada del subtipo G por parte de STAR, del subtipo J por Rega y del subtipo A por Stanford (Gifford *et al.*, 2006; Holguín *et al.*, 2008c).

Con respecto a las variantes recombinantes, la sensibilidad de las herramientas automatizadas disminuye drásticamente para los recombinantes distintos al CRF01_AE y CRF02_AG, pobremente representados en las bases de datos de estas herramientas. Por ejemplo, ni STAR ni Stanford pudieron clasificar correctamente ningún recombinante distinto a estos dos CRF, si bien el número incluido de estos recombinantes era limitado ($n=15$) por su baja presencia en España. Por otra parte, las herramientas son ineficientes para detectar URF, en aumento en la pandemia. Sólo NCBI, Rega y STAR pudieron identificar alguno, pero con baja sensibilidad. Esta información resultaría útil en países donde los recombinantes complejos son más frecuentes. De hecho, los URF suponen el 4% de las infecciones mundiales por VIH-1 (Hemelaar *et al.*, 2011). Por último, la distribución de las variantes del VIH-1 es diferente según la herramienta usada. Es decir, los resultados de un estudio de epidemiología molecular del virus cambiarían dependiendo de la herramienta que se utilice y de la prevalencia de no-B, especialmente recombinantes (**Figura 4.1**).

Tabla 4.7: Estudios de las limitaciones de las herramientas automatizadas de subtipaje que incluyen variantes no-B del VIH-1.

Referencia	País	Nº de secuencias incluidas (nº de variantes diferentes)	Región viral	Método de subtipaje incluido									
				AF	Stanford	Rega	Geno2pheno	TherapyEdge	STAR	EuResist	NCBI	jpHMM	LANL
Presente estudio (Anexo III)	España	83 secuencias no-B (5 subtipos, 12 CRF)	<i>pol</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Yebra <i>et al.</i> , 2010	España	587 subtipos B 128 no-B (6 subtipos, 11 CRF)	<i>pol</i>	X	X	X	X			X	X		
Wilkinson y Engelbrecht, 2009	Sudáfrica	226 subtipos B 10 no-B (3 subtipos, 7 URF)	Genoma completo	X		X						X	
Galán <i>et al.</i> , 2009	España	1 subtipo B 56 no-B (5 subtipos, 8 CRF, 11 URF, 3 U)	<i>pol</i>	X	X	X	X				X		X
Holguín <i>et al.</i> , 2008c	España	14 subtipos B 277 PR / 171 TI no-B (8 subtipos, 9 CRF)	<i>pol</i>	X	X	X					X		
Holguín <i>et al.</i> , 2008d	España	33 subtipos B 5 no-B (1 CRF, 4 URF)	Genoma completo	X	X	X					X		
Ntemgwa <i>et al.</i> , 2008	Canadá	4 secuencias del mismo URF	<i>pol</i>	X	X	X	X		X			X	X
Loveday y MacRae, 2006	R. Unido	1.002 no-B y B	<i>pol</i>		X	X			X		X		X
Gifford <i>et al.</i> , 2006	R. Unido	10.503 PR / 10.476 TI no-B y B	<i>pol</i>		X	X			X				
Smith <i>et al.</i> , 2005	R. Unido	81 no-B (5 subtipos, 2 CRF) 19 subtipos B	<i>env</i>	X							X		X

jpHMM, *jumping profile Hidden Markov Model* (**Anexo I**); LANL, herramientas RIP o BLAST del Laboratorio Nacional de Los Álamos, EE.UU (**Anexo I**); U, sin clasificar; R. Unido, Reino Unido. La “X” indica la inclusión del método correspondiente en cada estudio.

Las discrepancias entre las herramientas y el AF podrían ser explicadas por las diferencias en los métodos de subtipaje que utilizan y las bases de datos de referencia con las que cuentan. Las variantes fueron definidas por AF utilizando el método de distancia *neighbour-joining* (NJ). Entre las herramientas probadas, sólo Rega se basa en filogenia, aplicando también NJ combinado con el *bootscanning*. Sin embargo, Rega tiene un umbral que evita la asignación de un subtipo/CRF a la secuencia problema si no consigue suficiente apoyo estadístico. Esto restringe su eficacia a pesar de usar AF. Es sorprendente que la mayor sensibilidad fue obtenida por herramientas que realizan únicamente una búsqueda tipo BLAST, asignando a la secuencia problema el subtipo/CRF de la referencia más similar que encuentren en su base de datos (Geno2pheno, EuResist, TherapyEdge, Stanford y NCBI). En concreto, NCBI analiza la secuencia problema por porciones, y cada porción es comparada con las referencias por BLAST. Sin embargo, este método provoca una sobrestimación de la recombinación, mayor cuantas más secuencias de referencia se incluyan, como se vio al comparar las versiones de 2005 y 2009. Con NCBI, la inclusión de múltiples referencias con alta similitud confunde los resultados en lugar de mejorarlos. Algunos CRF son muy similares y difíciles de distinguir en el gen *pol* y es por tanto difícil obtener resultados fiables con sistemas basados en análisis BLAST.

Por su parte, STAR es un método estadístico que crea, para cada variante, matrices de puntuación específica para cada posición para así elaborar perfiles específicos de subtipo. Pero, al igual que con Rega, hay muchos casos donde STAR no asigna subtipo alguno si el valor P que obtiene no supera un umbral. Las listas de referencia utilizadas por cada herramienta también son importantes para explicar sus discrepancias. Mientras que STAR y Stanford excluyen de sus referencias cualquier CRF que no sea CRF01_AE o CRF02_AG, Rega y Geno2pheno incluyen hasta el CRF14_BG, y TherapyEdge hasta el CRF19_cpx. La última versión de NCBI (2009) incluyó referencias de los 45 CRF descritos hasta ese año, si bien no ha sido actualizada desde entonces (en la actualidad se han descrito 51 CRF).

Por lo tanto, este trabajo revela que, al igual que ocurría con los algoritmos de interpretación de resistencias, las herramientas de subtipaje deberían ser actualizadas incrementando el número de secuencias de cada variantes no-B en

sus bases de datos. Así, se desaconseja su uso para estudios de epidemiología molecular del VIH-1. Según los resultados obtenidos, para casos concretos y cuando el uso de AF no es una opción, se recomendaría el uso de EuResist, Geno2pheno y/o TherapyEdge como las mejores herramientas para cohortes con predominancia del subtipo B. A pesar de la gran especificidad de Rega y STAR por el subtipo B, quedaron sin asignar demasiadas secuencias. En cualquier caso, el uso de varias herramientas en lugar de una sola sería recomendable, para comparar sus resultados. Para entender el subtipaje incorrecto del VIH-1 usando estas herramientas hay que tener en cuenta 1) la proporción de no-B en la cohorte de estudio; 2) la prevalencia de recombinantes distintos de CRF01_AE y CRF02_AG entre esos no-B; 3) la herramienta utilizada para el subtipaje; 4) la proporción de variantes no-B identificadas erróneamente como subtipo B y viceversa, lo que puede subestimar la prevalencia de no-B o B; y 5) la alta tasa de secuencias, especialmente no-B, que quedan sin asignar en los casos de STAR y Rega.

A pesar de que las cohortes aquí utilizadas para evaluar los algoritmos de interpretación y las herramientas automatizadas para el subtipaje del VIH-1 son amplias, el número de muestras para determinados subtipos y/o recombinantes fue limitado. Sería más apropiado contar con un número significativo de cada variante del VIH-1 en lugar de incluirlas todas en un mismo grupo como se hizo para el análisis de la interpretación genotípica de resistencias, dado que cada variante tiene sus propias características genéticas. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la desigual distribución de las variantes no-B en nuestro país. Este tipo de evaluaciones son de utilidad en regiones similares a la nuestra en cuanto a la epidemiología molecular del virus. Sin embargo, en países en desarrollo, donde son prevalentes las variantes no-B y especialmente los recombinantes, ambos tipos de aplicaciones verían muy mermada su utilidad y cometerían importantes fallos.

Los resultados del trabajo descrito en este capítulo fueron incluidos en parte en dos artículos de investigación, incluidos en el **Anexo III**.

CONCLUSIONES |

1. La inmigración implica la aparición de diferentes sub-epidemias de VIH-1 en Madrid, con importantes diferencias entre sí en función del origen y demás características epidemiológicas de los pacientes.
2. Al contrario que los pacientes españoles y latinoamericanos, los pacientes infectados por VIH-1 subsaharianos son más frecuentemente mujeres, han contraído el virus mediante prácticas heterosexuales, y presentan enfermedades infecciosas endémicas y una infección por VIH más avanzada.
3. A pesar de lo anterior, el tratamiento antirretroviral disponible en nuestro ámbito parece ser igualmente efectivo en todos ellos tras un año de seguimiento, si bien los pacientes subsaharianos sufren un mayor índice de pérdidas de seguimiento clínico.
4. La prevalencia de mutaciones de resistencia transmitidas en población autóctona tiende a disminuir. Sin embargo, esta tasa es creciente en pacientes subsaharianos, probablemente influida por los programas de tratamiento en sus países originales y por sus especiales características socio-culturales.
5. La inclusión de los pacientes en redes de transmisión del VIH fue más frecuente para hombres que tienen sexo con hombres en comparación con heterosexuales o drogadictos, y para españoles o latinoamericanos en comparación con subsaharianos.
6. La inmigración ha provocado la llegada de cepas del VIH-1 distintas al subtipo B, la variante prevalente en países desarrollados. Sin embargo, en la actualidad estas cepas no-B se encuentran tanto en inmigrantes como entre población VIH-positiva autóctona.
7. A pesar de que la prevalencia de formas no-B es muy alta en pacientes africanos, la epidemia de estas cepas en Madrid no es autosuficiente sino que, en general, su presencia se debe a múltiples introducciones del virus.
8. Una excepción a lo anterior son los recombinantes originarios de América Latina, cuya presencia en España se espera que aumente, ya que la transmisión

de las distintas variantes parece determinada por el perfil de los pacientes, especialmente la categoría de exposición.

9. La variabilidad propia de las variantes no-B del VIH-1 en posiciones de resistencia a fármacos provoca discrepancias en la interpretación genotípica de resistencias, lo que dificulta su uso en la práctica clínica con estas variantes.
10. Las herramientas automatizadas de subtipaje rápido del VIH-1 presentan limitaciones, especialmente para la identificación de variantes recombinantes del virus. Por ello, el análisis filogenético sigue siendo el único método fiable para los estudios de epidemiología molecular.

BIBLIOGRAFÍA |

- Aghokeng AF, Mpoudi-Ngole E, Dimodi H, Atem-Tambe A, Tongo M, Butel C, Delaporte E y Peeters M (2009) Inaccurate diagnosis of HIV-1 group M and O is a key challenge for ongoing universal access to antiretroviral treatment and HIV prevention in Cameroon. *PLoS One*; 4:e7702.
- Agwale SM, Zeh C, Paxinos E, Odama L, Pienazek D, Wambebe C, Kalish ML y Ziermann R (2006) Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naive Nigerian patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 22:22-6.
- Bannister WP, Cozzi-Lepri A, Clotet B, Mocroft A, Kjaer J, Reiss P, von Wyl V, Lazzarin A, Katlama C, Phillips AN, *et al.* (2008) Transmitted drug resistant HIV-1 and association with virologic and CD4 cell count response to combination antiretroviral therapy in the EuroSIDA Study. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 48:324-33.
- Barouch DH (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature*; 455:613-9.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, *et al.* (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220:868-71.
- Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, Somogyi S, Kollan C, Jessen H, Dupke S y Hamouda O (2010) Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS ONE*; 5:e12718.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, *et al.* (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS ONE*; 4:e4724.
- Blower SM, Aschenbach AN, Gershengorn HB y Kahn JO (2001) Predicting the unpredictable: transmission of drug-resistant HIV. *Nat Med*; 7:1016-20.
- Bouchaud O, Le Moing V, Simon F, Ngo Van P, Perre P, Hocqueloux L, Lebouche B, Carret S y Spire B (2011) Similar short-term efficacy of antiretroviral therapy in patients infected with HIV B and non-B subtype strains in france. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 56:e67-9.
- Brennan CA, Yamaguchi J, Devare SG, Foster GA y Stramer SL (2010) Expanded evaluation of blood donors in the United States for human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and antiretroviral drug-resistant strains: 2005 through 2007. *Transfusion*; 50:2707-12.

- Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, Essex M y Wainberg MA (2006) HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS*; 20:F9-13.
- Brenner BG, Roger M, Stephens D, Moisi D, Hardy I, Weinberg J, Turgel R, Charest H, Koopman J y Wainberg MA (2011) Transmission clustering drives the onward spread of the HIV epidemic among men who have sex with men in Quebec. *J Infect Dis*; 204:1115-9.
- Briones C y Domingo E (2008) Minority report: hidden memory genomes in HIV-1 quasispecies and possible clinical implications. *AIDS Rev*; 10:93-109.
- Caro-Murillo AM, Castilla Catalan J y del Amo Valero J (2010) Epidemiología de la infección por VIH en inmigrantes en España: fuentes de información, características, magnitud y tendencias. *Gac Sanit*; 24:81-8.
- Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S, Miró JM, Podzamczar D, Rubio R, Riera M, Viciano P, López Aldeguez J, Iribarren JA, *et al.* (2007) Spanish cohort of naive HIV-infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 25:23-31.
- Caro-Murillo AM, Gutiérrez F, Ramos JM, Sobrino P, Miró JM, Lopez-Cortes LF, Tural C, Moreno A, Gil ID, Angoiti JM, *et al.* (2009) HIV infection in immigrants in Spain: Epidemiological characteristics and clinical presentation in the CoRIS Cohort (2004-2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 27:380-8.
- Collazos J, Asensi V y Carton JA (2007) Sex differences in the clinical, immunological and virological parameters of HIV-infected patients treated with HAART. *AIDS*; 21:835-43.
- Chaix ML, Descamps D, Wirten M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, Schneider V, Izopet J, Masquelier B, Rouzioux C, *et al.* (2009) Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *AIDS*; 23:717-24.
- Chalmet K, Staelens D, Blot S, Dinakis S, Pelgrom J, Plum J, Vogelaers D, Vandekerckhove L y Verhofstede C (2010) Epidemiological study of phylogenetic transmission clusters in a local HIV-1 epidemic reveals distinct differences between subtype B and non-B infections. *BMC Infect Dis*; 10:262.
- Champenois K, Bocket L, Deuffic-Burban S, Cotte L, Andre P, Choisy P y Yazdanpanah Y (2008) Expected response to protease inhibitors of HIV-1 non-B subtype viruses according to resistance algorithms. *AIDS*; 22:1087-9.
- de Arellano ER, Benito JM, Soriano V, López M y Holguín Á (2007) Impact of ethnicity and HIV type 1 subtype on response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 23:891-4.

- de Mendoza C, Rodriguez C, Colomina J, Tuset C, Garcia F, Eiros JM, Corral A, Leiva P, Agüero J, Torre-Cisneros J, *et al.* (2005) Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis*; 41:1350-4.
- Delgado E, Thomson MM, Villahermosa ML, Sierra M, Ocampo A, Miralles C, Rodríguez-Pérez R, Diz-Aren J, Ojea-de Castro R, Losada E, *et al.* (2002) Identification of a newly characterized HIV-1BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 29:536-43.
- Díez M, Oliva J, Sánchez F, Vives N, Cevallos C y Izquierdo A (2011) Incidencia de nuevos diagnósticos de VIH en España, 2004-2009. *Gac Sanit*; avance online.
- Djoko CF, Wolfe ND, Vidal N, Tamoufe U, Montavon C, LeBreton M, Pike BL, Fair J, Mbacham WF, Benito A, *et al.* (2010) HIV type 1 pol gene diversity and genotypic antiretroviral drug resistance mutations in Malabo, Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26:1027-31.
- Drummond AJ y Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*; 7:214.
- ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe (2011). HIV/AIDS surveillance in Europe 2010. En: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0009/127656/e94500.pdf.
- Emerman M y Malim MH (1998) HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*; 280:1880-4.
- Fernández-García A, Pérez-Álvarez L, Cuevas MT, Delgado E, Muñoz-Nieto M, Cilla G, Iribarren JA, Pinilla M, Ocampo A, Miralles C, *et al.* (2010) Identification of a new HIV type 1 circulating BF intersubtype recombinant form (CRF47_BF) in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 26:827-32.
- Fisher M, Pao D, Brown AE, Sudarshi D, Gill ON, Cane P, Buckton AJ, Parry JV, Johnson AM, Sabin C, *et al.* (2010) Determinants of HIV-1 transmission in men who have sex with men: a combined clinical, epidemiological and phylogenetic approach. *AIDS*; 24:1739-47.
- Frange P, Galimand J, Vidal N, Goujard C, Deveau C, Souala F, Peeters M, Meyer L, Rouzioux C y Chaix ML (2008) New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996-2006 in France: the French ANRS C006 primo cohort study. *Retrovirology*; 5:69.
- Galán JC, Aguilera A, González-Alba JM, Rodríguez-Calviño JJ, Moldes Suárez LM, Pérez-Elías MJ y Regueiro B (2009). Can the rapid subtyping tools identify the increasing new HIV-recombinant forms? 7th European HIV Drug Resistance Workshop, Estocolmo, Suecia.

- Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA y Yoshida M (1988) HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature*; 333:504.
- Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, Fearnhill E, Pillay D y Dunn D (2009) Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*; 48:1296-305.
- GeSIDA (2012). Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Actualización enero 2012. En: <http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/gesidadcyr2011-Documentoconsenso-TAR-adulto-verordenador.pdf>.
- Gifford R, de Oliveira T, Rambaut A, Myers RE, Gale CV, Dunn D, Shafer R, Vandamme AM, Kellam P, Pillay D, *et al.* (2006) Assessment of automated genotyping protocols as tools for surveillance of HIV-1 genetic diversity. *AIDS*; 20:1521-9.
- Gifford RJ, de Oliveira T, Rambaut A, Pybus OG, Dunn D, Vandamme AM, Kellam P y Pillay D (2007) Phylogenetic surveillance of viral genetic diversity and the evolving molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*; 81:13050-6.
- González-Alba JM, Holguín Á, García R, García-Bujalance S, Alonso R, Suárez A, Delgado R, Cardeñoso L, González R, García-Bermejo I, *et al.* (2011) Molecular surveillance 1 of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J Virol*; 85:10755-63.
- Gonzalez LM, Santos AF, Abecasis AB, Van Laethem K, Soares EA, Deforche K, Tanuri A, Camacho R, Vandamme AM y Soares MA (2008) Impact of HIV-1 protease mutations A71V/T and T74S on M89I/V-mediated protease inhibitor resistance in subtype G isolates. *J Antimicrob Chemother*; 61:1201-4.
- Grossman Z, Paxinos EE, Averbuch D, Maayan S, Parkin NT, Engelhard D, Lorber M, Istomin V, Shaked Y, Mendelson E, *et al.* (2004) Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother*; 48:2159-65.
- Hamers RL, Wallis CL, Kityo C, Siwale M, Mandaliya K, Conradie F, Botes ME, Wellington M, Osibogun A, Sigaloff KC, *et al.* (2011) HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naïve individuals in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: a multicentre observational study. *Lancet Infect Dis*; 11:750-9.
- Harrison L, Castro H, Cane P, Pillay D, Booth C, Phillips A, Geretti AM y Dunn D (2010) The effect of transmitted HIV-1 drug resistance on pre-therapy viral load. *AIDS*; 24:1917-22.

- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD y Osmanov S (2011) Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*; 25:679-89.
- Herrero MD, Rivas P, Rallón NI, Ramírez-Olivencia G y Puente S (2007) HIV and malaria. *AIDS Rev*; 9:88-98.
- Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Mellors JW, Pillay D, *et al.* (2008) Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*; 47:266-85.
- Holguín Á, de Mulder M, Yebra G, López M y Soriano V (2008a) Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res*; 6:327-34.
- Holguín Á, López M, Molinero M y Soriano V (2008b) Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J Clin Microbiol*; 46:2918-23.
- Holguín Á, López M y Soriano V (2008c) Reliability of rapid subtyping tools compared to that of phylogenetic analysis for characterization of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and recombinant forms. *J Clin Microbiol*; 46:3896-9.
- Holguín Á, Lospitao E, López M, de Arellano ER, Pena MJ, del Romero J, Martín C y Soriano V (2008d) Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J Med Virol*; 80:383-91.
- Holguín Á, Ramírez de Arellano E, Rivas P y Soriano V (2006a) Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev*; 8:98-107.
- Holguín Á, Sune C, Hamy F, Soriano V y Klimkait T (2006b) Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J Clin Virol*; 36:264-71.
- Hué S, Clewley JP, Cane PA y Pillay D (2004) HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS*; 18:719-28.
- Hué S, Gifford RJ, Dunn D, Fernhill E y Pillay D (2009) Demonstration of sustained drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 lineages circulating among treatment-naive individuals. *J Virol*; 83:2645-54.

- Hué S, Pillay D, Clewley JP y Pybus OG (2005) Genetic analysis reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102:4425-9.
- Hughes GJ, Fearnhill E, Dunn D, Lycett SJ, Rambaut A y Leigh Brown AJ (2009) Molecular phylodynamics of the heterosexual HIV epidemic in the United Kingdom. *PLoS Pathog*; 5:e1000590.
- INE: Instituto Nacional de Estadística (2011). En: <http://www.ine.es/>.
- Jain V, Liegler T, Vittinghoff E, Hartogensis W, Bacchetti P, Poole L, Loeb L, Pilcher CD, Grant RM, Deeks SG, *et al.* (2010) Transmitted drug resistance in persons with acute/early HIV-1 in San Francisco, 2002-2009. *PLoS ONE*; 5:e15510.
- Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Díaz RS, Kallas EG, Janini LM, Liegler T, Pilcher CD, Grant RM, *et al.* (2011) Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J Infect Dis*; 203:1174-81.
- Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, Ron Y, Preston BD y Dougherty JP (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol*; 74:1234-40.
- Kantor R y Katzenstein D (2003) Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev*; 5:25-35.
- Kijak GH, Rubio AE, Pampuro SE, Zala C, Cahn P, Galli R, Montaner JS y Salomon H (2003) Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. *HIV Med*; 4:72-8.
- Kinomoto M, Appiah-Opong R, Brandful JA, Yokoyama M, Nii-Trebi N, Ugly-Kwame E, Sato H, Ofori-Adjei D, Kurata T, Barre-Sinoussi F, *et al.* (2005) HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis*; 41:243-51.
- Kiwanuka N, Laeyendecker O, Quinn TC, Wawer MJ, Shepherd J, Robb M, Kigozi G, Kagaayi J, Serwadda D, Makumbi FE, *et al.* (2009) HIV-1 subtypes and differences in heterosexual HIV transmission among HIV-discordant couples in Rakai, Uganda. *AIDS*; 23:2479-84.
- Korber B y Gnanakaran S (2009) The implications of patterns in HIV diversity for neutralizing antibody induction and susceptibility. *Curr Opin HIV AIDS*; 4:408-17.
- Kouyos RD, von Wyl V, Yerly S, Böni J, Taffe P, Shah C, Bürgisser P, Klimkait T, Weber R, Hirschel B, *et al.* (2010) Molecular epidemiology reveals long-term changes in HIV type 1 subtype B transmission in Switzerland. *J Infect Dis*; 201:1488-97.

- Leigh Brown AJ, Frost SD, Mathews WC, Dawson K, Hellmann NS, Daar ES, Richman DD y Little SJ (2003) Transmission fitness of drug-resistant human immunodeficiency virus and the prevalence of resistance in the antiretroviral-treated population. *J Infect Dis*; 187:683-6.
- Levy JA (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*; 57:183-289.
- Lewis F, Hughes GJ, Rambaut A, Pozniak A y Leigh Brown AJ (2008) Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics. *PLoS Med*; 5:e50.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, *et al.* (2002) Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*; 347:385-94.
- Loveday C y MacRae E (2006) Limitations in using online tools to determine HIV-1 subtype in clinical patients: a comparison of 5 tools. *Antivir Ther*; 11:S129.
- Llenas-García J, Rubio R, Hernando A, Fiorante S, Maseda D, Matarranz M, Costa JR, Alonso B y Pulido F (2012) Características clínico-epidemiológicas de los pacientes inmigrantes con infección por el VIH: estudio de 371 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; avance online.
- Martinez-Cajas JL, Pant-Pai N, Klein MB y Wainberg MA (2008) Role of genetic diversity amongst HIV-1 non-B subtypes in drug resistance: a systematic review of virologic and biochemical evidence. *AIDS Rev*; 10:212-23.
- Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, Gifford R, Balestre E, Jorgensen LB, Pedersen C, van der Hoek L, Prins M, Balotta C, *et al.* (2005) Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 40:505-11.
- Muesing MA, Smith DH, Cabradilla CD, Benton CV, Lasky LA y Capon DJ (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature*; 313:450-8.
- Muñoz M, Carmona R, Pérez-Álvarez L, Cilla G, Suárez MD, Delgado E, Contreras G, Corral J, de Goicoetxea MJ, Medrano L, *et al.* (2005) Analysis of discrepancies in the interpretation of antiretroviral drug resistance results in HIV-1 infected patients of Basque Country, Spain. *J Clin Virol*; 33:224-9.
- Ndembi N, Hamers RL, Sigaloff KC, Lyagoba F, Magambo B, Nanteza B, Watera C, Kaleebu P y Rinke de Wit TF (2011) Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala. *AIDS*; 25:905-10.
- Ntemgwá M, Gill MJ, Brenner BG, Moisi D y Wainberg MA (2008) Discrepancies in assignment of subtype/recombinant forms by genotyping programs for HIV

- type 1 drug resistance testing may falsely predict superinfection. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 24:995-1002.
- OMS, UNICEF y ONUSIDA (2010). Hacia el acceso universal: expansión de las intervenciones prioritarias contra el VIH/sida en el sector de la salud. Informe 2010 sobre los progresos realizados. En: <http://www.who.int/hiv/pub/2010progressreport/es/index.html>.
- ONUSIDA (2011). Informe sobre la epidemia mundial de sida 2010. En: http://www.unaids.org/globalreport/Global_report_es.htm.
- Pant Pai N, Shivkumar S y Martinez-Cajas JL (2012) Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naïve HIV-1 infected individuals?: a systematic review of evidence: 1996-2010. *J Acquir Immune Defic Syndr*; Jan 20: avance online.
- Pao D, Fisher M, Hue S, Dean G, Murphy G, Cane PA, Sabin CA y Pillay D (2005) Transmission of HIV-1 during primary infection: relationship to sexual risk and sexually transmitted infections. *AIDS*; 19:85-90.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM y Ho DD (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*; 271:1582-6.
- Pérez Molina JA, Rillo MM, Suárez-Lozano I, Casado Osorio JL, Cobo RT, González PR, Clotet EP, Jerez AH, Pedrol PD, Royuela A, *et al.* (2010) Do HIV-infected immigrants initiating HAART have poorer treatment-related outcomes than autochthonous patients in Spain? Results of the GESIDA 5808 study. *Curr HIV Res*; 8:521-30.
- Poonpiriya V, Sungkanuparph S, Leechanachai P, Pasomsub E, Watitpun C, Chunhakan S y Chantratita W (2008) A study of seven rule-based algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic resistance data in Thailand. *J Virol Methods*; 151:79-86.
- Porter K, Pillay D, Cane P, Dean G, Churchill D, Baily G, Drake S, Fisher M y Resistance atUCGoMtToHD (2001) Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *BMJ*; 322:1087-8.
- Ravela J, Betts BJ, Brun-Vezinet F, Vandamme AM, Descamps D, van Laethem K, Smith K, Schapiro JM, Winslow DL, Reid C, *et al.* (2003) HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 33:8-14.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, *et al.* (2000) HIV-1 nomenclature proposal. *Science*; 288:55-6.

- Rouet F, Chaix ML, Nerrienet E, Ngo-Giang-Huong N, Plantier JC, Burgard M, Peeters M, Damond F, Ekouevi DK, Msellati P, *et al.* (2007) Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 45:380-8.
- Sagir A, Oette M, Kaiser R, Daumer M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Knechten H, Schmutz G, Hower M, Emmelkamp J, *et al.* (2007) Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother*; 60:843-8.
- Shapiro B, Rambaut A y Drummond AJ (2006) Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. *Mol Biol Evol*; 23:7-9.
- SINIVIH (2011). Vigilancia Epidemiológica del VIH/Sida en España: Sistema de Información sobre Nuevos Diagnósticos de VIH y Registro Nacional de Casos de Sida. Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida/Centro Nacional de Epidemiología, Madrid. En: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/Informe_VIH-sida_Junio_2011.pdf.
- Skar H, Axelsson M, Berggren I, Thalme A, Gyllensten K, Liitsola K, Brummer-Korvenkontio H, Kivela P, Spangberg E, Leitner T, *et al.* (2011) Dynamics of two separate but linked HIV-1 CRF01_AE outbreaks among injection drug users in Stockholm, Sweden, and Helsinki, Finland. *J Virol*; 85:510-8.
- Smith M, Geretti AM, Osner N, Easterbrook P y Zuckerman M (2005) High levels of discordance between sequencing and serological subtyping in a predominantly non-B subtype HIV-1 infected cohort. *J Clin Virol*; 33:312-8.
- Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, *et al.* (2006) Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*; 50:694-701.
- The SPREAD Programme (2008) Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS*; 22:625-35.
- Thomson MM, Fernández-García A, Delgado E, Vega Y, Díez-Fuertes F, Sánchez-Martínez M, Pinilla M, Castro MA, Marino A, Ordoñez P, *et al.* (2012) Rapid expansion of a HIV-1 subtype F cluster of recent origin among men who have sex with men in Galicia, Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 59:e49-e51.
- UK Cohorts: UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, UK Collaborative HIV Cohort Study, UK Register of HIV Seroconverters. (2007) Evidence of a decline in transmitted HIV-1 drug resistance in the United Kingdom. *AIDS*; 21:1035-9.

- Van de Vijver DAMC, Wensing AMJ, Angarano G, Asjö B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Costagliola D, Op de Coul EL, *et al.* (2005) Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. *Antivir Ther*; 10:S145.
- Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, De Luca A, Palmisano L, Paraskevis D, Paredes R, Poljak M, Schmit JC, Soriano V, *et al.* (2011) European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev*; 13:77-108.
- Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, Hamouda O, Kucherer C, Struck D, Schmit JC, Asjö B, *et al.* (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis*; 200:1503-8.
- Vergne L, Snoeck J, Aghokeng A, Maes B, Valea D, Delaporte E, Vandamme AM, Peeters M y Van Laethem K (2006) Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naive and treated patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 46:53-62.
- von Wyl V, Kouyos RD, Yerly S, Böni J, Shah C, Bürgisser P, Klimkait T, Weber R, Hirschel B, Cavassini M, *et al.* (2011) The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J Infect Dis*; 204:1095-103.
- Weintrob AC, Grandits GA, Agan BK, Ganesan A, Landrum ML, Crum-Cianflone NF, Johnson EN, Ordonez CE, Wortmann GW y Marconi VC (2009) Virologic response differences between African Americans and European Americans initiating highly active antiretroviral therapy with equal access to care. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 52:574-80.
- Wilkinson E y Engelbrecht S (2009) Molecular characterization of non-subtype C and recombinant HIV-1 viruses from Cape Town, South Africa. *Infect Genet Evol*; 9:840-6.
- Wittkop L, Gunthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, de Luca A, Kucherer C, Obel N, von Wyl V, Masquelier B, *et al.* (2011) Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis*; 11:363-71.
- Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, Van Marck E, *et al.* (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*; 455:661-4.
- Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C y Holguín Á (2010) HIV-1 non-B subtypes: high transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res*; 85:409-17.

- Yebra G, de Mulder M, Martín L, Rodríguez C, Labarga P, Viciano I, Berenguer J, Alemán MR, Pineda JA, García F, *et al.* (2012) Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*; 50:407-13.
- Yebra G y Holguín Á (2010) Epidemiología de la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 resistente a antirretrovirales en pacientes naïve en España. *Med Clin (Barc)*; 135:561-7.
- Yerly S, Junier T, Gayet-Ageron A, Amari EB, von Wyl V, Gunthard HF, Hirschel B, Zdobnov E y Kaiser L (2009) The impact of transmission clusters on primary drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *AIDS*; 23:1415-23.
- Yerly S, von Wyl V, Ledergerber B, Böni J, Schupbach J, Bürgisser P, Klimkait T, Rickenbach M, Kaiser L, Günthard HF, *et al.* (2007) Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS*; 21:2223-9.
- Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Korber B y Leitner T (2010) The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*; 7:25.
- Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y, Preston BD y Dougherty JP (2002) Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol*; 76:11273-82.

ANEXO I

Recursos en internet

PÁGINAS WEB UTILIZADAS

- CPR (*Calibrated Population Resistance*, Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>

- HIValg (Universidad de Stanford, EE. UU.)
<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=hivalgs>

- Listado de CRF del LANL
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>

- Alineamientos de secuencias VIH del LANL
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>

- Herramienta RIP (*Recombinant Identification Program*) del LANL
<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>

- Herramienta HIV BLAST del LANL
http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html

- ClustalX
<http://www.clustal.org/>

- PHYLP (Phylogeny Inference Package)
<http://www.phylip.com/>

- Calculadora estadística, Unidad de Bioestadística Clínica Hospital Ramón y Cajal
http://www.hrc.es/investigacion/bioest/otras_calculadoras.html

- PAUP* (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods)*)
<http://www.paup.csit.fsu.edu/>

- Herramienta BLAST del NCBI
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

–BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*)

<http://beast.bio.ed.ac.uk/>

–Sociedad Internacional de Sida de los EE. UU. (IAS-USA)

<http://www.iasusa.com/>

ALGORITMOS DE INTERPRETACIÓN GENOTÍPICA DE RESISTENCIAS

–ANRS (Agencia Nacional de Investigación del Sida francesa)

<http://www.hivfrenchresistance.org/>

–HIVdb (Universidad de Stanford, EE. UU.)

<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>

–Rega (Universidad de Leuven, Bélgica)

<http://regaweb.med.kuleuven.be/>

–Geno2pheno (Instituto Max Planck de Informática, Alemania)

<http://www.geno2pheno.org/>

–RIS (Red de Investigación en Sida, España)

<http://www.retic-ris.net/>

HERRAMIENTAS AUTOMATIZADAS DE SUBTIPAJE DEL VIH-1

–HIVdb (Universidad de Stanford, EE. UU.)

<http://hivdb.stanford.edu/>

–REGA Subtyping Tool (Universidad de Leuven, Bélgica)

<http://jose.med.kuleuven.be/genotypetool/html/indexhiv.html>

–STAR (University College de Londres, Reino Unido)

<http://www.vgb.ucl.ac.uk/starn.shtml>

–EuResist Prediction System (Red Europea EuResist)

http://engine.euresist.org/data_analysis/viral_sequence/new

–NCBI Genotyping Tool

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>

–jpHMM (*Jumping profile Hidden Markov Model*, Universidad de Gotinga, Alemania)

<http://jphmm.gobics.de>

ANEXO II

Material adicional

ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CRF INCLUIDOS EN ESTA TESIS

CRF	Distribución Geográfica	Estructura
CRF01_AE	Sudeste asiático Asia oriental África central	
CRF02_AG	África occidental África central	
CRF03_AB	Europa oriental Asia central	
CRF06_cpx	África central África occidental Estonia	
CRF11_cpx	África central	
CRF12_BF	Sudamérica	
CRF14_BG	España (Galicia)	
CRF15_01B	Tailandia	

(continúa)

ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CRF INCLUIDOS EN ESTA TESIS (cont.)

CRF	Distribución Geográfica	Estructura
CRF17_BF	Sudamérica	<p>Diagram of CRF17_BF structure. Regions: gag (positions 795-961), pol (3097-3710), vif (8054-8385), tat (7084-7041), rev (8019-8054), env (8019-8054), nef (8019-8054). Color-coded: B (blue), F (green).</p>
CRF19_cpx	Cuba África central	<p>Diagram of CRF19_cpx structure. Regions: gag (776-1208), pol (4520-5011), vif (4671-5011), tat (6415-8194), rev (8011-8071), env (8011-8071), nef (8112-8412). Color-coded: A (red), D (pink), C (green).</p>
CRF20_BG	Cuba	<p>Diagram of CRF20_BG structure. Regions: gag (445-2952), pol (2744-3352), vif (4449-5153), tat (5153-5156), rev (8019-8071), env (8019-8071), nef (8019-8071). Color-coded: C (green), B (blue).</p>
CRF22_01A1	Camerún	<p>Diagram of CRF22_01A1 structure. Regions: gag (795-1208), pol (4520-5011), vif (4671-5011), tat (6415-8194), rev (8011-8071), env (8011-8071), nef (8112-8412). Color-coded: A1 (red), 01 (purple).</p>
CRF23_BG	Cuba	<p>Diagram of CRF23_BG structure. Regions: gag (445-2952), pol (2744-3352), vif (4449-5153), tat (5153-5156), rev (8019-8071), env (8019-8071), nef (8019-8071). Color-coded: C (green), B (blue).</p>
CRF24_BG	Cuba	<p>Diagram of CRF24_BG structure. Regions: gag (445-2952), pol (2744-3352), vif (4449-5153), tat (5153-5156), rev (8019-8071), env (8019-8071), nef (8019-8071). Color-coded: C (green), B (blue).</p>
CRF28_BF	Brasil	<p>Diagram of CRF28_BF structure. Regions: gag (803-1323), pol (3072-3710), vif (8054-8385), tat (7084-7041), rev (8019-8054), env (8019-8054), nef (8019-8054). Color-coded: B (blue), F (green).</p>
CRF42_BF	Luxemburgo	Estructura no publicada
CRF47_BF	España (Galicia)	<p>Diagram of CRF47_BF structure. Regions: gag (400-1218), pol (3111-3710), vif (4025-4294), tat (4011-4046), rev (8019-8054), env (8019-8054), nef (8019-8054). Color-coded: B (blue), F (green).</p>

Adaptado de <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.

LISTADOS DE MUTACIONES DE RESISTENCIA A ANTIRRETROVIRALES UTILIZADOS

Listado OMS actualización 2009			Listado IAS-USA actualización 2010			
IP	ITIAN	ITINAN	IP <i>major</i>	IP <i>minor</i>	ITIAN	ITINAN
L23I	M41L	L100I	D30N	L10V/I/R/F/C	M41L	V90I
L24I	K65R	K101E/P	V32I	V11I	A62V	A98G
D30N	D67N/G/E	K103N/S	M46I/L	G16E	K65R	L100I
V32I	T69D/ins	V106M/A	I47V/A	K20R/M/I/T/V	D67N	K101E/H/P
M46I/L	K70R/E	V179F	G48V	L24I	T69ins	K103N
I47V/A	L74V/I	Y181C/I/V	I50L/V	L33I/V/F	K70R/E	V106M/A/I
G48V/M	V75M/T/A/S	Y188L/H/C	I54M/L	E34Q	L74V	V108I
I50V/L	F77L	G190A/S/E	Q58E	M36I/L/V	V75I	E138A/G/K
F53L/Y	Y115F	P225H	T74P	K43T	F77L	V179D/F/T
I54V/L/M/A/T/S	F116Y	M230L	L76V	F53L/Y	Y115F	Y181C/I/V
G73S/T/C/A	Q151M		V82A/T/F/S/L	I54V/T/A/S	F116Y	Y188C/L/H
L76V	M184V/I		N83D	D60E	Q151M	G190S/A
V82A/T/F/S/C/M/L	L210W		I84V	I62V	M184V/I	P225H
N83D	T215Y/F/rev		N88S	L63P	L210W	M230L
I84V/A/C	K219Q/E/N/R		L90M	I64L/M/V	T215Y/F/rev	
I85V				H69K/R	K219Q/E	
N88D/S				A71V/I/T/L		
L90M				G73C/S/T/A		
				V77I		
				V82I		
				N83D		
				I85V		
				N88D		
				L89M/V/I		
				I93L/M		

En azul, sustituciones no incluidas en el otro listado.

ANEXO III

Publicaciones

PUBLICACIONES SURGIDAS DE ESTA TESIS (incluidas al final de este anexo)

Yebra G, Holguín Á, Pillay D y Hué S (2012) Phylogenetic and demographic characterization of HIV-1 transmission in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* (enviado).

Yebra G, de Mulder M, Pérez-Elías MJ, Pérez-Molina JA, Galán JC, Llenas-García J, Moreno S, y Holguín Á (2011) Increase of transmitted drug resistance among HIV-infected sub-Saharan Africans residing in Spain in contrast to the native population. *PLoS ONE*; 6: e26757.

Yebra G, de Mulder M, Martín L, Pérez-Cachafeiro S, Rodríguez C, Labarga P, García F, Tural C, Jaén À, Navarro G, y Holguín Á; en nombre de CoRIS (2011) Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS). *Antivir Res*; 89:19-25.

Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, y Holguín Á (2010) HIV-1 non-B subtypes: high transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antivir Res*; 85:409-17.

Yebra G, Rivas P, Herrero MD, López M, de Mulder M, Puente S, Ramírez-Olivencia G, Soriano V, y Holguín Á (2009) Clinical differences and viral diversity between newly HIV-diagnosed African and non-African patients in Spain (2005-2007). *AIDS Res and Hum Retroviruses*; 25:37-44.

OTRAS PUBLICACIONES

Yebra G, de Mulder M, Martín L, Rodríguez C, Labarga P, Viviana I, Berenguer J, Alemán MR, Pineda JA, García F, y Holguín Á; en nombre de CoRIS (2012) Most HIV-1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*; 50:407-13.

Yebra G y Holguín Á (2011) Mutation Vif-22H, which allows HIV-1 to use the APOBEC3 hypermutation to develop resistance, could appear faster in certain non-B variants. *J Antimicrob Chemother*; 66:941-2.

de Mulder M, **Yebra G**, Martín L, Prieto L, Mellado MJ, Rojo P, Muñoz-Fernández MA, Jiménez de Ory S, Ramos JT y Holguín Á (2011) Drug resistance and HIV-1 variant characterization in naïve and pretreated HIV-1 infected pediatric population in Madrid. *J Antimicrob Chemother*; 66:2362-71.

Holguín Á, Erazo K, Escobar G, de Mulder M, **Yebra G**, Martín L, Jovel LE, Castaneda L y Pérez E, en nombre del Proyecto Esther (2011) Drug resistance prevalence and HIV-1 variant characterization in HIV-1 infected pediatric populations in Honduras and El Salvador during 1989-2009 period. *Pediatr Infect Dis J*; 30 e82-e87.

Yebra G y Holguín Á (2010) Epidemiología de la transmisión de VIH-1 resistente a antirretrovirales en pacientes *naïve* en España. *Med Clin (Barc)*; 135:561-7.

Yebra G y Holguín Á (2008) The maturation inhibitor bevirimat (PA-457) can be active in patients carrying HIV type-1 non-B subtypes and recombinants. *Antivir Ther*; 13:1083-5.

Holguín Á, de Mulder M, **Yebra G**, López M y Soriano V (2008) Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res*; 6:327-34.

Increase of Transmitted Drug Resistance among HIV-Infected Sub-Saharan Africans Residing in Spain in Contrast to the Native Population

Gonzalo Yebra¹, Miguel de Mulder¹, María Jesús Pérez-Elías², José Antonio Pérez-Molina², Juan Carlos Galán³, Jara Llenas-García⁴, Santiago Moreno², África Holguín^{1*}

1 HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Microbiology Department, IRYCIS-Hospital Ramón y Cajal and CIBER-ESP, Madrid, Spain, **2** Infectious Diseases Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain, **3** Microbiology Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain, **4** HIV Unit, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain

Abstract

Background: The prevalence of transmitted HIV drug resistance (TDR) is stabilizing or decreasing in developed countries. However, this trend is not specifically evaluated among immigrants from regions without well-implemented antiretroviral strategies.

Methods: TDR trends during 1996–2010 were analyzed among naïve HIV-infected patients in Spain, considering their origin and other factors. TDR mutations were defined according to the World Health Organization list.

Results: *Pol* sequence was available for 732 HIV-infected patients: 292 native Spanish, 226 sub-Saharan Africans (SSA), 114 Central-South Americans (CSA) and 100 from other regions. Global TDR prevalence was 9.7% (10.6% for Spanish, 8.4% for SSA and 7.9% for CSA). The highest prevalences were found for protease inhibitors (PI) in Spanish (3.1%), for non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) in SSA (6.5%) and for nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) in both Spanish and SSA (6.5%). The global TDR rate decreased from 11.3% in 2004–2006 to 8.4% in 2007–2010. Characteristics related to a decreasing TDR trend in 2007–10 were Spanish and CSA origin, NRTI- and NNRTI-resistance, HIV-1 subtype B, male sex and infection through injection drug use. TDR remained stable for PI-resistance, in patients infected through sexual intercourse and in those carrying non-B variants. However, TDR increased among SSA and females. K103N was the predominant mutation in all groups and periods.

Conclusion: TDR prevalence tended to decrease among HIV-infected native Spanish and Central-South Americans, but it increased up to 13% in sub-Saharan immigrants in 2007–2010. These results highlight the importance of a specific TDR surveillance among immigrants to prevent future therapeutic failures, especially when administering NNRTIs.

Citation: Yebra G, de Mulder M, Pérez-Elías MJ, Pérez-Molina JA, Galán JC, et al. (2011) Increase of Transmitted Drug Resistance among HIV-Infected Sub-Saharan Africans Residing in Spain in Contrast to the Native Population. PLoS ONE 6(10): e26757. doi:10.1371/journal.pone.0026757

Editor: Vittoria Colizza, INSERM & Université Pierre et Marie Curie, France

Received: June 17, 2011; **Accepted:** October 3, 2011; **Published:** October 25, 2011

Copyright: © 2011 Yebra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 09/00284). AH is supported by Agencia Lain Entralgo. GY is supported by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (FSE). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aholguin.hcii@salud.madrid.org

Introduction

The presence of transmitted drug resistance mutations (TDR) in patients unexposed to highly active antiretroviral treatment (HAART) is a major problem in the management of HIV-1 infection. Several studies have described a high risk of virological failure to first therapy in patients harbouring resistance mutations conferring resistance to any of the drugs received. Nevertheless, first-treatment guided by initial resistance testing achieves similar efficacy in patients with primary drug resistance as in patients with wild-type virus [1–4]. Therefore, international guidelines recommend that initial treatment choice should depend on the HIV resistant test results prior to starting HAART [5–7].

Numerous works have analysed the TDR prevalence in Western Europe and the United States. After several years with

a continuous increase in the TDR rate [8–10], the efficacy of HAART and the development of both new antiretroviral drugs and classes have led to stable [2,11–14] or decreasing trends [15,16] of TDR. However, the TDR trends could be intimately related to the antiretroviral programmes implemented in each region, but only few studies have reported TDR prevalences according to the origin of the patients [11,17]. Given that immigrant patients account for a growing portion of the HIV-infected population in developed countries, the presence and trends of TDR among this subgroup should be explored in detail. In Spain, a third of newly HIV-diagnosed patients are immigrants [18–19], most of them coming from Central and South America or sub-Saharan Africa. The special socio-cultural characteristics of these populations as well as the antiretroviral policies established in their regions of origin may affect the transmission of resistant variants. Therefore, we

analyze here the changes in the TDR rate through the last 15 years in a large set of HIV-infected naïve patients taking into account their origin.

Materials and Methods

Study population

A total of 732 HIV-1-infected patients diagnosed between 1996 and 2010 with at least one *pol* sequence prior to any antiretroviral treatment were included. Most (>98%) were under follow-up in different HIV/AIDS clinics in Madrid, Spain. The origin of the patients (i.e., self-reported place of birth) was: 292 native Spanish, 226 sub-Saharan Africans (SSA), 114 Central and South Americans (CSA), 26 East Europeans (including Russia), 20 West Europeans and North Americans, 3 North Africans, 2 Asians and 49 of unknown origin. The most frequent countries of origin for SSA were Equatorial Guinea (111 patients), Nigeria (28), Sierra Leone (10) and Liberia (7). For CSA, Ecuador (20), Argentina (15), Colombia (14), Brazil (13) and Cuba (13). For East Europeans Romania (10) and Russia (7). Finally, for West Europeans, the most frequent origins were France and Portugal (6 each). Both protease (PR) and reverse transcriptase (RT) sequences were available for 641 patients, only PR sequence for 89 patients and only RT for 2 patients. Most (495, 67.6% [CI: 64.2–71]) of the HIV-1 sequences included had been previously published [20–21]. The remaining were collected from Hospital Ramón y Cajal ($n = 218$) and Hospital Doce de Octubre ($n = 19$) in Madrid, Spain. This study was part of a project approved by the review board of the Hospital Ramón y Cajal Clinical Research Ethical Committee. It was designed to protect the rights of all subjects involved under the appropriate local regulations. To maintain subject confidentiality, a unique ID number was assigned to each specimen, and written consent obtained for each patient by clinicians.

Drug resistance

The prevalence of transmitted drug resistance was defined according to the list of mutations for TDR surveillance as recommended by the World Health Organization [22] using the Calibrated Population Resistance tool [23]. Genotypic interpretation of these resistance mutations was evaluated using the Stanford HIVdb Algorithm [24], version 6.0.11. Resistance was normalized in three levels: susceptible (S), intermediate (I), and resistant (R).

HIV-1 subtyping

HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRF) were identified by phylogenetic analysis of the *pol* sequences. The 2008 version of the subtype reference dataset provided by Los Alamos National Laboratory was used. At least two representative sequences of each 9 subtypes and the 43 CRF of HIV-1 group M available at the moment of the analysis were taken as references. DNA sequences were aligned using the ClustalX 2.0.11 program. The tree topology was obtained using the Neighbour-Joining method. The pairwise distance matrix was estimated using the Kimura two-parameter model within the DNAdist program, as implemented in the PHYLIP software package. Bootstrap resampling (1,000 data sets) of the multiple alignments was performed, with the bootstrap cut-off set at 700.

Statistical analysis

Prevalences were expressed in percentage and 95% confidence interval (CI). Continuous variables were compared using the *t*-test. Categorical variables were compared using the chi-square test or Fisher's exact test if appropriate. Association between

epidemiological, clinical and virological factors was analysed by univariate and multivariate logistic regression. The maximum model included the variables of origin of the patient, route of HIV infection, HIV subtype and time period of infection. Changes over time in the resistance prevalences were analysed using a chi-square test for trends (linear-by-linear association). Significance was set at $p < 0.05$.

Results

TDR prevalence (i.e., to any antiretroviral drug class) among the 732 patients diagnosed in Madrid, Spain, between 1996 and 2010 was 9.7% (CI: 7.6–11.8) (**Figure 1**). **Table 1** shows the main characteristics of the population comparing patients infected with wild-type viruses with those harbouring TDR. Regarding the antiretroviral drug class, TDR prevalence among patients in our study was 2.9% (CI: 1.7–4.1) for PR inhibitors (PI) (3.1% [CI: 1.1–5.1] in Spanish, 1.8% [CI: 0.1–3.5] in SSA and 1.7% [CI: –0.7–4.2] in CSA), 6.1% (CI: 4.2–7.9) for nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTI) (6.4% [CI: 3.6–9.3] in Spanish, 6.5% [CI: 2.8–10.2] in SSA and 5% [CI: 0.7–9.4] in CSA), and 5.4% (CI: 3.7–7.2) for non-nucleoside RT inhibitors (NNRTI) (5% [CI: 2.5–7.6] in Spanish, 6.5% [CI: 2.8–10.2] in SSA and 4% [CI: 0.2–7.9] in CSA). To assess the TDR prevalence according to the calendar year, sequences were grouped in three periods (2000–03, 2004–06 and 2007–10) according to the observed resistance trend by calendar year. Sequences obtained before year 2000 were included in the global estimates but excluded in the analyses due to their low number ($n = 32$) and representativeness since all were sequences from immigrant patients. In the whole study population, the TDR prevalence to any antiretroviral drug was 10.6% (CI: 5.3–15.9), 11.3% (CI: 7.8–14.8) and 8.4% (CI: 5–11.8) in those periods, respectively (p trend = 0.35). In the following paragraphs, the TDR prevalences and temporal trends in these periods are detailed according to different factors.

According to drug class

As observed in the global TDR prevalence, the presence of transmitted PI-resistance mutations reached a maximum in 2004–06 (4.1% [CI: 1.9–6.3]), and declined to its minimum value (1.6% [CI: 0–3.2]) in the last period (2007–10) (p trend = 0.23). On the other hand, rates of both NRTI- and NNRTI-resistance declined progressively and significantly along the three periods: 13.2% (CI: 5.2–21.3), 6.1% (CI: 3.4–8.7) and 4.4% (CI: 1.9–6.9), for NRTI (p trend = 0.03) and 10.3% (CI: 3.1–17.5), 5.8% (CI: 3.2–8.4) and 3.6% (CI: 1.3–5.9), for NNRTI (p trend = 0.04). This decline was more pronounced for NRTI-resistance mutations, getting closer to the NNRTI-resistance mutations rate in the last period (**Figure 2a**). Thus, transmitted resistance to RT inhibitors was two or threefold higher than that for PI in 2007–10 ($p = 0.06$).

According to HIV-1 variant

Subtype B was found in 383 (52.3%, [CI: 48.7–55.9]) patients, meanwhile non-B subtypes and recombinants infected 349 (47.7% [CI: 44.1–51.3]) patients. Among them, the most frequent variants were: CRF02_AG (128 patients), subtype A (36), subtype G (35), CRF12_BF (23) and subtype C (22). Although global TDR prevalence was similar in subtype B and in non-B variants (10.2% [CI: 7.1–13.2] vs. 9.2% [CI: 6.1–12.2], $p = 0.64$) their TDR temporal trend was different (**Figure 2b**): in subtype B, TDR declined from 12.5% (CI: 3.1–21.9) in 2000–03 to 6.8% (CI: 2.3–11.4) in 2007–10 (p trend = 0.16), but in non-B variants this prevalence remained stable (9.5% [CI: 3.2–15.8] and 9.8% [CI: 4.7–14.8], respectively [p trend = 0.99]). Of note, TDR was higher

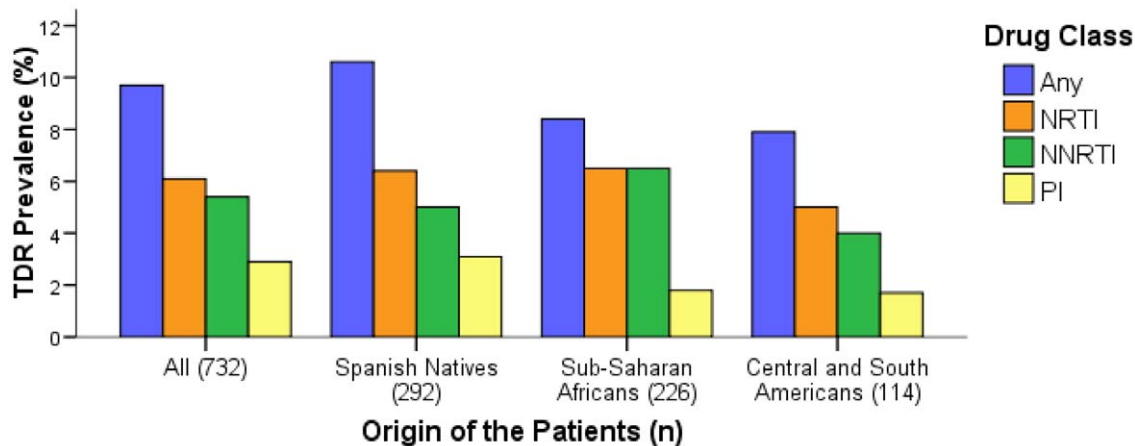


Figure 1. Prevalence of TDR to each drug class according to the origin of the patients. TDR, transmitted drug resistance; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitors; n, number of patients. doi:10.1371/journal.pone.0026757.g001

in non-B than in subtype B (9.8% [CI: 4.7–14.8] vs. 6.8% [CI: 2.3–11.4], $p = 0.54$) in the last period.

According to the origin of patients

Global TDR prevalences were 10.6% (CI: 7.1–14.1) in native Spanish, 8.4% (CI: 4.8–12) in SSA and 7.9% (CI: 2.9–12.8) in

CSA (**Figure 1**). Regarding the temporal trends in each population (**Figure 2c**), TDR declined constantly in Spanish natives: 13.2% (CI: 2.41–23.9) in 2000–03, 11.8% (6.7–17) in 2004–06 and 8% (CI: 2.7–13.3) in 2007–10 (p trend = 0.28). In CSA, no TDR mutations were detected in 2000–03, but TDR reached similar rates as in natives in the following periods: 10.2%

Table 1. Comparison of characteristics between patients infected with virus harbouring TDR and patients infected with wild-type virus.

	Total	With TDR	Wild-type	p value	OR (95% CI) in univariate analysis
Patients (n)	732	71 (9.7)	661 (90.3)	-	
Origin [n (%)]					
Spain	292 (39.9)	31 (43.7)	261 (39.5)	0.5	1
SSA	226 (30.9)	19 (26.8)	207 (31.3)	0.4	0.77 (0.42–1.40)
CSA	114 (15.6)	9 (12.7)	105 (15.9)	0.47	0.73 (0.33–1.58)
Other	100 (13.7)	12 (16.9)	88 (13.3)	0.38	1.15 (0.57–2.33)
Sex [n (%)] ^a					
Male	469 (68.6)	47 (69.1)	422 (68.5)	0.92	1
Female	215 (31.4)	21 (30.9)	194 (31.5)	0.92	1.67 (0.50–5.58)
Route of transmission [n (%)] ^b					
Heterosexual contact	269 (49.4)	23 (44.2)	246 (50.0)	0.43	1
Homo/bisexual contact	196 (36.0)	18 (34.6)	178 (36.2)	0.82	0.90 (0.46–1.78)
Injection drug use	68 (12.5)	9 (17.3)	59 (12.0)	0.27	1.58 (0.73–3.41)
Other	11 (2.0)	2 (3.8)	9 (1.8)	0.33	1.22 (0.70–2.12)
HIV-1 Subtype [n (%)]					
B	383 (52.3)	39 (54.9)	344 (52.0)	0.64	1
Non-B	349 (47.7)	32 (45.1)	317 (48.0)	0.64	0.89 (0.54–1.46)
Year of HIV-1 Infection [n (%)]					
<2000	32 (4.4)	0 (0)	32 (4.8)	-	0
2000–03	132 (18.0)	14 (19.7)	118 (17.8)	0.82	1
2004–06	318 (43.4)	36 (50.7)	282 (42.7)	0.19	1.08 (0.56–2.07)
2007–10	250 (34.1)	21 (29.6)	229 (34.6)	0.39	0.78 (0.38–1.58)

TDR, transmitted drug resistance; OR, odds ratio; CI, confidence interval; n, number of patients; SSA, sub-Saharan Africa; CSA, Central and South America.

^aData available for 684 patients.

^bData available for 544 patients.

^cData available for 541 patients.

doi:10.1371/journal.pone.0026757.t001

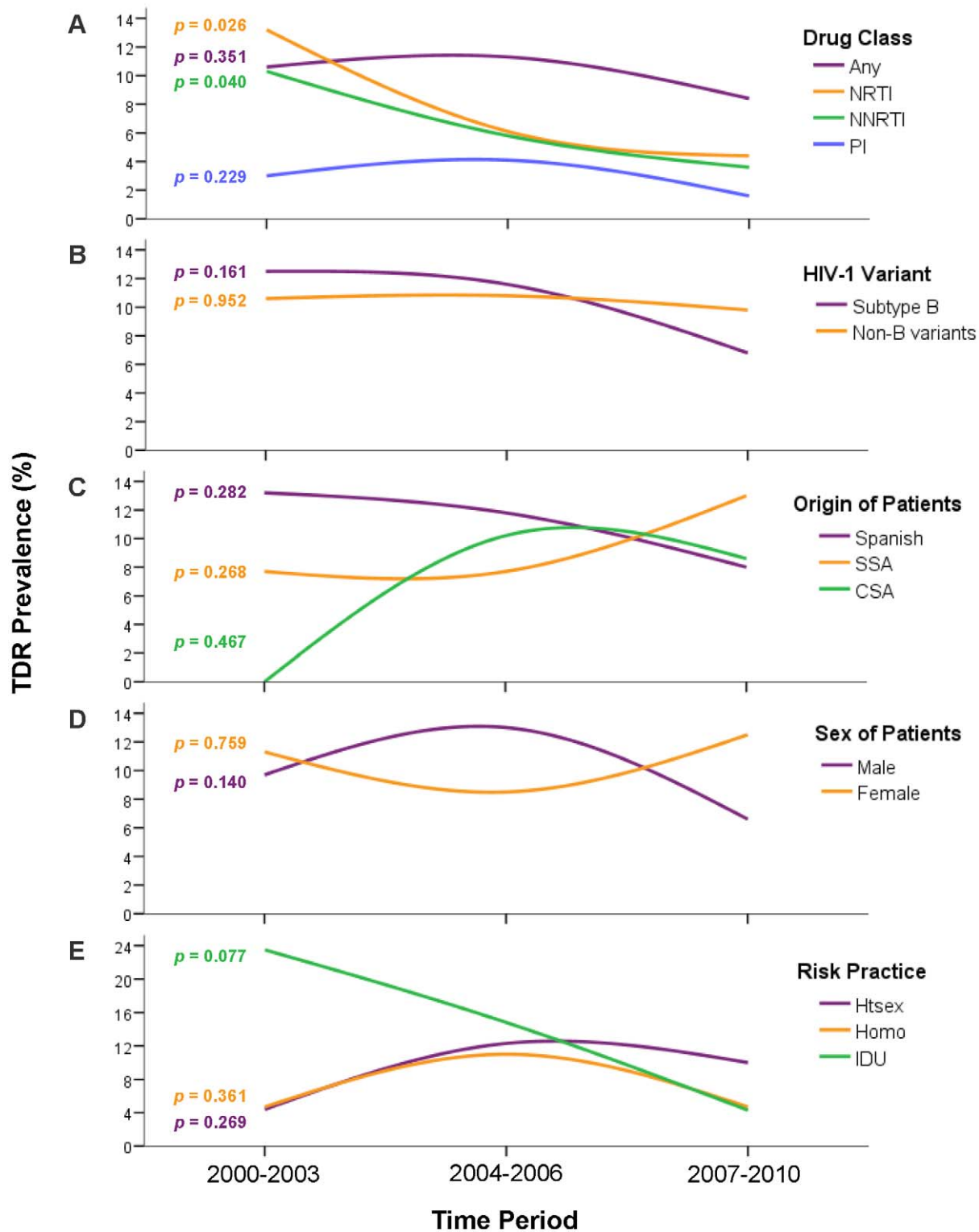


Figure 2. Temporal trends of TDR prevalence. The prevalences are detached according to A) drug class; B) HIV-1 variant; C) origin of the patients (as self-reported birth place); D) sex of the patients; and E) risk practice. TDR, transmitted drug resistance; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; PI, protease inhibitors; SSA, sub-Saharan Africa; CSA, Central and South America; Htsex, heterosexual contact; Homo, homo/bisexual contact; IDU, injection drug use. The p -values shown next to the lines and sharing color code correspond to the chi-square test for trend in each case.
doi:10.1371/journal.pone.0026757.g002

(CI: 2.5–17.9) in 2004–06 and 8.6% (CI: –0.7–17.8) in 2007–10 (p trend = 0.47). In contrast, among SSA the TDR prevalence remained stable in 2000–03 and 2004–06 (7.7% [CI: 1.2–14.2] in both cases) and rose up to 13% (CI: 5.1–21) in 2007–10 (p trend = 0.27). Thus SSA presented the highest TDR frequency in the last period. Finally, TDR prevalence was very high among East Europeans (5/26, 19.2% [CI: 4.1–34.4]) and West Europeans (3/20, 15% [CI: –0.6–30.6]), although the low number of patients did not allow to differentiate the prevalence according to temporal trend.

According to sex of the patients

Most (68.6% [CI: 65.1–72]) of the subjects with available data were males (**Table 1**). Global TDR prevalence was similar between them and females (10% [CI: 7.3–12.7] *vs.* 9.8% [CI: 5.8–13.7], respectively, $p = 0.97$). Although this similarity was observed in 2000–03 (9.7% [CI: 2.3–17] *vs.* 11.3% [CI: 3.4–19.2]), TDR increased among male patients but decreased among females in 2004–06 (13% [CI: 8.7–17.4] *vs.* 8.5% [CI: 1.4–15.6], $p = 0.46$) and vice versa in 2007–10 (6.6% [CI: 2.8–10.3] *vs.* 12.5% [CI: 4.9–20.1], $p = 0.21$).

According to route of HIV infection of the patients

Half (49.4% [CI: 45.2–53.6]) of the patients with known route of transmission had been infected through heterosexual intercourse (**Table 1**). TDR prevalence was higher (13.2% [CI: 5.2–21.3]) in injection drug users (IDU) and similar in those infected through homo/bisexual (9.2% [CI: 5.1–13.2]) and heterosexual (8.5% [CI: 5.2–11.9]) intercourse. Regarding the temporal trend, there was a drastic decrease in the TDR rate among IDU ($n = 68$), the most common risk practice in Spain until the late 90 s. This rate was 23.5% (CI: 3.4–43.7; 4/17 patients) in 2000–03, 14.8% (CI: 1.4–28.2; 4/27) in 2004–06 and 4.3% (CI: –4–12.7; 1/23) in 2007–10 (p trend = 0.08). Among homo/bisexuals, the prevalence

rose from 2000–03 (4.7% [CI: –4.3–13.9]) to 2004–06 (12.6% [CI: 6.44–18.8]) but decreased to the initial level in the last period (4.7% [CI: –0.5–10]) (p trend = 0.36). Finally, the TDR rate in heterosexuals seemed to stabilize after an increase from 2000–03 (4.4% [CI: –0.5–9.3]) to 2004–06 (12.3% [CI: 4.8–19.9]), and was the risk practice with the highest TDR prevalence in 2007–10 (10% [CI: 4.1–15.9]) (p trend = 0.32).

Patients infected with viruses harbouring TDR mutations

Among the 71 patients harbouring TDR mutations (**Table 1**), 31 were Spanish, 19 SSA, 9 CSA, 5 East Europeans, 3 West Europeans, 1 North African and 3 of unknown origin. In three quarters (53, 74.6% [CI: 64.2–84.8]) of the cases, TDR affected only a single drug class. However, in 6 patients (4 Spanish, 1 SSA and 1 CSA) a triple-class resistance was found. The pattern of TDR mutations was different for NRTI- and PI-resistance according to the origin (**Figure 3**). Among SSA, RT-M184I/V and PR-M46L were the most frequent mutations, respectively, meanwhile in both Spanish natives and CSA, RT-T215rev and PR-V82A were the most prevalent substitutions. For NNRTI-resistance, K103N was the most frequent mutation in all groups, although its prevalence was higher in SSA (4.7% [CI: 1.5–7.8]). In fact, K103N was the most prevalent mutation in all periods, and it was the mutation found in a third of the cases (15/45) where a single TDR mutation was found. The temporal trend of specific mutation prevalences showed significant reductions from 2000–03 to 2007–10 for thymidine-analogue mutations together (8.8% [CI: 2.1–15.6] to 2.4% [CI: 0.5–4.3], p trend = 0.03) and K103N (10.3% [CI: 3.1–17.5] to 3.2% [CI: 1–5.4], p trend = 0.02) and non-significant reduction for M184I/V (4.4% [CI: –0.5–9.3] to 2.4% [CI: 0.5–4.3], p trend = 0.67). In the logistic model (**Table 1**), there was no significant difference in the prevalence of TDR according to sex, year or route of HIV-1 infection or origin of the patients.

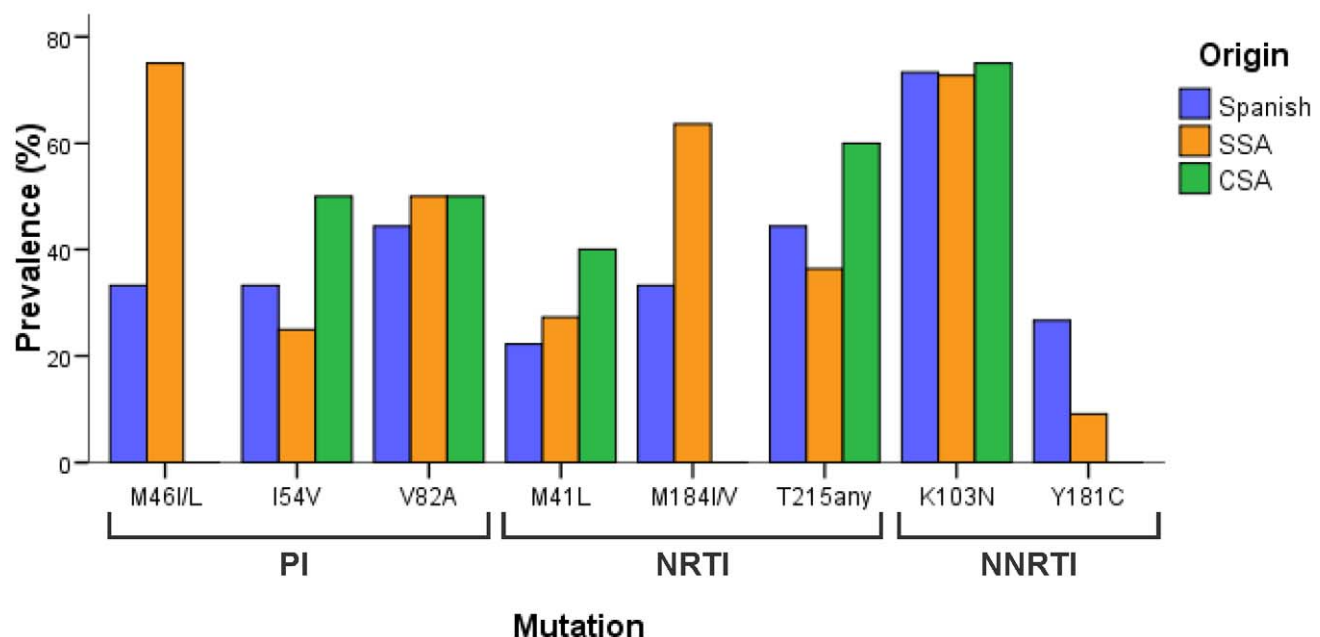


Figure 3. Prevalence of individual mutations among the patients infected with HIV-1 variants harbouring any TDR. SSA, sub-Saharan Africa; CSA, Central and South America; PI, protease inhibitors; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.

doi:10.1371/journal.pone.0026757.g003

Clinical implications of TDR

The analysis of the genotypic resistance interpretation of the 71 *pol* sequences harbouring TDR (**Figure 4**) revealed that especially in the case of PI there are options to select a fully active drug even in patients carrying PI-resistance mutations if the treatment choice is guided by the resistance test. Actually, none of the 21 patients with PI-resistance mutations presented high resistance levels to all PI tested due to their susceptibility to new-generation drugs like darunavir or tipranavir. Among the 39 patients with NRTI-resistance mutations, only 5 (12.8% [CI: 2.3–23.3]) presented some level of resistance to all NRTI included. Furthermore, 14 (35.9% [CI: 20.8–50.9]) and 16 (41% [CI: 25.6–56.5]) were fully susceptible to the most used NRTI combinations, emtricitabine/tenofovir and lamivudine/abacavir. Regarding NNRTI-resistance, none of the 34 patients with resistance mutations was fully susceptible to efavirenz and nevirapine, the most used drugs of this class. Only etravirine would have some level of activity in these patients.

Differences in HIV viral load

Patients infected with HIV variants harbouring TDR presented a significantly lower mean viral load compared to those infected with wild-type HIV (4.1 log [SD: 0.83] *vs.* 4.4 log [SD: 0.83] RNA-HIV-1 copies/ml, $p=0.03$). This result was also obtained when comparing patients infected with viruses carrying or not the mutation M184I/V (3.9 log [SD: 0.86] *vs.* 4.4 log [SD: 0.83], $p=0.04$). In addition, according to sex, male patients presented a significantly higher viral load than female patients (4.5 log [SD: 0.79] *vs.* 4.2 log [SD: 0.89], $p<0.001$) at diagnosis time. There were no differences in plasma HIV viraemia according to origin, risk practice, HIV infection year or HIV subtype in the study population.

Transmission clusters

Phylogenetic analyses only revealed a cluster of drug-resistance mutations transmission. This involved a native Spanish and a Chilean diagnosed in 2006 in the same clinic and infected with three-drug class resistant subtype B viruses. Both specimens

harboured mutations F53L and L90M at PR and M41L, K103N, L210W and T215D at RT.

Discussion

This study explores the evolution of TDR rates through 15 years (1996–2010) in a large set of HIV-infected naïve patients diagnosed in Spain taking into account different factors: drug class, viral variant, origin of the patient, route of infection and sex. The global TDR prevalence reported in this work (9.7%) is in agreement with the most representative European studies, where this rate has stabilized around 10% [1,11,12,15]. In the USA, the TDR prevalence has traditionally been higher, but it also has started to stabilize [4,25]. According to our results, the rate of transmitted NRTI-resistance is clearly dropping in Spain until reaching the levels of NNRTI-resistance, as already reported in other developed countries [11,15]. In addition, in three quarters of the cases the transmission of resistance is limited to a single class.

The stabilization of TDR rates is partially due to the high efficacy of the HAART in Europe, where there is universal access to this treatment. However, in other regions where treatment is not available to all HIV-infected people on a regular basis, emergence and transmission of HIV resistant variants is likely to happen. Thus, it could be assumed that the TDR trend previously reported in developed countries will be observed in developing regions as treatment programmes are implemented. According to this, low TDR prevalences found in the last years in regions with shorter HAART tradition [26–27] are expected to be followed by a peak as seen in Europe around years 2002–03. This has been reported in African regions with an older treatment scale-up [28–30]. Here, we describe a growing TDR prevalence among sub-Saharan patients (SSA) in contrast to the native HIV-infected population and the general trends reported in West Europe. A high rate of losses to follow-up has been described among SSA under treatment in Spain probably due to a low educational level and their high geographic mobility looking for work [31]. Due to an ineffective follow-up, drug-resistance variants can be emerging and circulating among treated SSA and eventually producing TDR events within this subgroup. Given that SSA patients

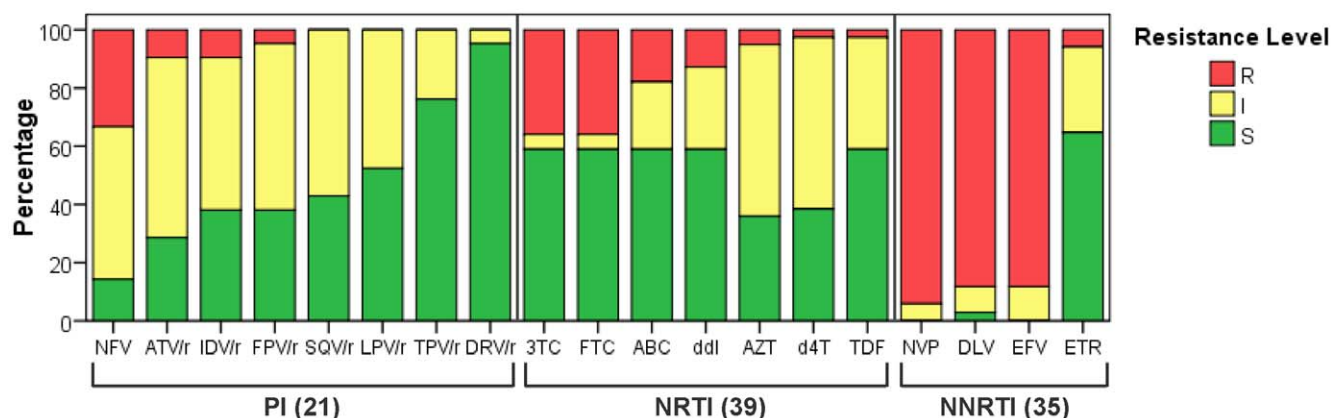


Figure 4. Predicted susceptibility to antiretroviral drugs of the 71 viruses carrying TDR mutations. Susceptibility was estimated according to the HIVdb Interpretation Algorithm (Stanford University, Palo Alto, CA, USA). TDR, transmitted drug resistance; PI, protease inhibitors: nelfinavir (NFV); atazanavir/r (ATV/r); indinavir/r (IDV/r); fosamprenavir/r (FPV/r); saquinavir/r (SQV/r); lopinavir/r (LPV/r); tipranavir/r (TPV/r) and darunavir/r (DRV/r), where “/r” indicates co-administration with low-dose ritonavir (RTV) for pharmacological “boosting”. NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors: lamivudine (3TC), emtricitabine (FTC), abacavir (ABC), didanosine (ddl), zidovudine (AZT), stavudine (d4T), tenofovir (TDF). NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: nevirapine (NVP), delavirdine (DLV), efavirenz (EFV), etravirine (ETR); R, high level resistance; I, intermediate resistant; S, susceptible.

doi:10.1371/journal.pone.0026757.g004

occasionally come to Spain to receive antiretroviral treatment and return afterwards to Africa, transmission of HIV resistant variants within this collective could be happening either in Africa or in Spain. Thus, the observed increasing TDR trend among infected SSA in our study population, the high prevalence of HIV-1 non-B variants in that collective, and the different NRTI-resistance TDR pattern found in SSA than in native Spanish, would strongly suggest that SSA in Spain could have acquired the infection in their countries of origin or in Spain through infected Africans carrying resistant viruses.

On the other hand, we observed an absence of TDR in 2000-03 among the 18 CSA in our cohort. However, TDR rates reached similar levels as in native Spanish in the following periods. This could be due to the low number of CSA patients included in the first period or to the limited scale up access to treatment in these regions. Nowadays, TDR trends in CSA patients are expected to be similar to trends among Spanish because antiretroviral therapy programmes have been working in most of these countries for at least a decade [32]. Also the presence of non-B variants typical from certain regions of Central and South America (CRF12_BF in Argentina and Chile and CRF23_BG in Cuba) among CSA patients harbouring resistant strains suggests that these infections probably occurred before arriving to Spain. Despite their low representation, both East and West Europeans (26 and 20 patients, respectively) showed TDR prevalences beyond 15%. Nevertheless, these patients infected with resistance variants were diagnosed before 2006, and were IDU in most cases, both characteristics related to a higher TDR prevalence according to our results.

Focusing on the HIV subtype, we describe a higher TDR prevalence in the last study period (2007-10) in patients carrying non-B variants *versus* subtype B. This was due to the TDR decrease among subtype B in contrast to its stabilization among non-B variants. This is in agreement with other studies reporting growing TDR rates in non-B *versus* subtype B [20,33]. However, most studies [11–13,15] report higher TDR rates in subtype B, although all of them describe the absolute prevalences in the entire study period and not the temporal trends according to the subtype. Our results could be misleading due to the high prevalence of non-B subtypes and recombinants among SSA patients. Actually, excluding SSA patients, non-B variants showed a decreasing TDR prevalence from 15.8% to 6.1% in the first and last period, respectively (results not shown). Therefore the increase was probably due to the origin, not to the subtype. On the other hand, the correlation between HIV subtype and birth place of the patients could also have confused the different mutational pattern described: the preferential presence of NRTI-resistance mutation M184I/V in SSA compared to T215revertants in Spanish and CSA could appear to be associated to the infection by non-B variants and subtype B, respectively, as reported in other countries [34,35]. However, the different antiretroviral strategies implemented in these regions could also be a probable cause of this different mutational pattern in the studied naïve HIV-1-infected patients carrying resistant viruses.

Our observation of a lower viral load among patients infected with variants carrying M184I/V has previously been described [36] due to the fitness reduction related to its acquisition. In addition, the lower viral load in female *versus* male at baseline has already been observed [37]. Regarding the analysis according to the route of infection, the decrease of the TDR rate among IDU across the years is a consequence of the evolution of HIV epidemics in Spain and a better treatment compliance among the IDU population. In the late 90 s the use of injecting drugs was by

far the first route of HIV infection, but clearly decreased while HIV transmission due to unprotected sexual contacts increased [19].

According to the genotypic resistance interpretation, the TDR mutations found in 71 patients mainly affect the NNRTI-based therapy, the first choice in Spain for naïve patients [7], due to the presence of K103N, the most frequent mutation in the study especially among SSA. Despite its transmission as a singleton mutation, K103N seriously compromises the use of efavirenz or nevirapine. Only etravirine, the second-generation NNRTI approved solely for salvage regimens, could have some level of activity in these patients. Therefore, resistance testing prior to first-line treatment choice is strongly recommended. In developed countries there are therapeutic options as new generation NNRTI, PI or even new classes as integrase or entry inhibitors. Unfortunately, all these options are not available in developing regions where NNRTI-resistance among naïve patients is rising [28]. Interestingly, the highest NNRTI-resistance prevalence in our study was found among SSA, although in some cases this could possibly be explained by unrecorded, prophylactic use of nevirapine in Africa. Our results also suggest that PI could be active in most naïve patients carrying PI-resistance mutations if the treatment choice were guided by the resistance test.

The main limitation of this study is the restricted number of patients which prevents a solid statistical support of the TDR trends, for instance analyzing East and West Europeans living in Spain. The delimitation of the study periods could also be a source of bias despite the fact they were selected to reflect the trend by calendar year as accurately as possible. In addition, sub-Saharan patients might be overrepresented due to the special care they receive in the Tropical Medicine Units ascribed to the clinics included in the work, especially patients from Equatorial Guinea, a former Spanish colony located between Cameroon and Gabon. Nevertheless, since the year 2000 the immigration in Spain has increased exponentially, particularly in Madrid, where 17% of the general population were foreigners in 2010. Finally, the surprisingly high rate in native Spanish of RT-M184I/V (4.4%), a mutation rapidly cleared due to its cost in terms of viral fitness [38], might reflect an unrecorded previous treatment exposure in some patients.

In summary, TDR prevalence in Spain follows the general trend in Western Europe. The TDR rate is decreasing especially for NRTI-resistance. However, the TDR trends during 2000–2010 differed according to the origin of the patients. Whereas in native Spanish and Central-South Americans the TDR rate is decreasing, we report for the first time an increasing TDR prevalence among sub-Saharan patients diagnosed in Spain, who form the collective with the highest TDR prevalence in Spain since 2007. This could be due to the special socio-cultural characteristics of these patients, which may compromise antiretroviral treatment compliance and follow-up. Since TDR is expected to increase in developing regions as treatment is implemented, the presented results highlight the importance of a specific TDR surveillance among immigrants living in high-income countries to prevent future therapeutic failures, especially when administering NNRTI due to the high K103N prevalence.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ÁH GY. Performed the experiments: GY MdM. Analyzed the data: GY MdM JAPM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MJPE JAPM JCG JLG SM. Wrote the paper: ÁH GY. Revised and contributed to the manuscript: ÁH GY MdM MJPE JAPM JCG JLG SM.

References

- Wittkop L, Gunthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, et al. (2011) Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 11: 363–371.
- Bannister WP, Cozzi-Lepri A, Clotet B, Mocroft A, Kjaer J, et al. (2008) Transmitted drug resistant HIV-1 and association with virologic and CD4 cell count response to combination antiretroviral therapy in the EuroSIDA Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 324–333.
- Oette M, Kaiser R, Daumer M, Petch R, Fatkenheuer G, et al. (2006) Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 573–581.
- Shet A, Berry L, Mohri H, Mehndru S, Chung C, et al. (2006) Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 439–446.
- Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. (2008) Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis* 47: 266–285.
- Vandamme AM, Camacho RJ, Ceccherini-Silberstein F, De Luca A, Palmisano L, et al. (2011) European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing: 2011 update. *AIDS Rev* 13: 77–108.
- Grupo de Estudio de Sida-SEIMC (2011) Documento de consenso de Gesida/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Actualización enero 2011. Available at: <http://www.gesida.seimc.org/pcientifica/fuentes/DcyRc/gesidadcyrc2011-Documentoconsenso-TAR-adulto-verordenador.pdf>.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, et al. (2002) Antiretroviral drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347: 385–394.
- Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, Gifford R, Balestre E, et al. (2005) Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40: 505–511.
- UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance (2001) Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *BMJ* 322: 1087–1088.
- Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, et al. (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 200: 1503–1508.
- Chaix ML, Descamps D, Wiriden M, Bocket L, Delaugerre C, et al. (2009) Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996–2006 in France. *AIDS* 23: 717–724.
- Yerly S, von Wyl V, Ledergerber B, Boni J, Schupbach J, et al. (2007) Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 21: 2223–2229.
- Bartmeyer B, Kuecherer C, Houareau C, Werning J, Keeren K, et al. (2010) Prevalence of transmitted drug resistance and impact of transmitted resistance on treatment success in the German HIV-1 Seroconverter Cohort. *PLoS ONE* 5: e12718.
- UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance, UK Collaborative HIV Cohort Study, UK Register of HIV Seroconverters (2007) Evidence of a decline in transmitted HIV-1 drug resistance in the United Kingdom. *AIDS* 21: 1035–1039.
- de Mendoza C, Rodríguez C, Colomina J, Tuset C, García F, et al. (2005) Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin Infect Dis* 41: 1350–1354.
- The SPREAD Programme (2008) Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS* 22: 625–635.
- Caro-Murillo AM, Gutiérrez F, Ramos JM, Sobrino P, Miró JM, et al. (2009) HIV infection in immigrants in Spain: Epidemiological characteristics and clinical presentation in the CoRIS Cohort (2004–2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27: 380–388.
- Ministerio de Ciencia e Innovación (2010) Vigilancia epidemiológica del VIH en España: nuevos diagnósticos de VIH en España, período 2003–2009. Actualización 30 de junio de 2010. Available at: http://www.isciii.es/htdocs/pdf/nuevos_diagnosticos_ccaa.pdf.
- Yebra G, de Mulder M, del Romero J, Rodríguez C, Holguín Á (2010) HIV-1 non-B subtypes: high transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res* 85: 409–417.
- Holguín Á, de Mulder M, Yebra G, López M, Soriano V (2008) Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr HIV Res* 6: 327–334.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, et al. (2009) Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS ONE* 4: e4724.
- Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, Kiuchi M, Hue S, et al. (2009) The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 25: 1197–1198.
- Liu TF, Shafer RW (2006) Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. *Clin Infect Dis* 42: 1608–1618.
- Jain V, Liegler T, Vittinghoff E, Hartogensis W, Bacchetti P, et al. (2010) Transmitted drug resistance in persons with acute/early HIV-1 in San Francisco, 2002–2009. *PLoS ONE* 5: e15510.
- Agwale SM, Zeh C, Paxinos E, Odama L, Pienazek D, et al. (2006) Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naïve Nigerian patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 22–26.
- Djoko CF, Wolfe ND, Vidal N, Tamoufe U, Montavon C, et al. (2010) HIV type 1 pol gene diversity and genotypic antiretroviral drug resistance mutations in Malabo, Equatorial Guinea. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 1027–1031.
- Ndembi N, Hamers RL, Sigaloff KC, Lyagoba F, Magambo B, et al. (2011) Transmitted antiretroviral drug resistance among newly HIV-1 diagnosed young individuals in Kampala. *AIDS* 25: 905–910.
- Price MA, Wallis CL, Lakhi S, Karita E, Kamali A, et al. (2011) Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27: 5–12.
- Hamers RL, Wallis CL, Kityo C, Siwale M, Mandaliya K, et al. (2011) HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naïve individuals in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: a multicentre observational study. *Lancet Infect Dis* 11: 750–759. doi:10.1016/S1473-3099(11)70149-9.
- Pérez Molina JA, Rillo MM, Suárez-Lozano I, Casado Osorio JL, Cobo RT, et al. (2010) Do HIV-infected immigrants initiating HAART have poorer treatment-related outcomes than autochthonous patients in Spain? Results of the GESIDA 5808 study. *Curr HIV Res* 8: 521–530.
- WHO, UNICEF, UNAIDS (2010) Towards universal access: Scaling up priority HIV/AIDS interventions in the health sector. Progress report 2010, Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/2010progressreport/en/index.html>.
- Sagir A, Oette M, Kaiser R, Daumer M, Fatkenheuer G, et al. (2007) Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J Antimicrob Chemother* 60: 843–848.
- Chilton DN, Castro H, Lattimore S, Harrison IJ, Fearnhill E, et al. (2010) HIV type-1 drug resistance in antiretroviral treatment-naïve adults infected with non-B subtype virus in the United Kingdom. *Antivir Ther* 15: 985–991.
- Chan PA, Kantor R (2009) Transmitted drug resistance in nonsubtype B HIV-1 infection. *HIV Ther* 3: 447–465.
- Harrison L, Castro H, Cane P, Pillay D, Booth C, et al. (2010) The effect of transmitted HIV-1 drug resistance on pre-therapy viral load. *AIDS* 24: 1917–1922.
- Collazos J, Asensi V, Carton JA (2007) Sex differences in the clinical, immunological and virological parameters of HIV-infected patients treated with HAART. *AIDS* 21: 835–843.
- Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, et al. (2011) Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J Infect Dis* 203: 1174–1181.



Sensitivity of seven HIV subtyping tools differs among subtypes/recombinants in the Spanish cohort of naïve HIV-infected patients (CoRIS)

Gonzalo Yebra^a, Miguel de Mulder^a, Leticia Martín^a, Santiago Pérez-Cachafeiro^b, Carmen Rodríguez^c, Pablo Labarga^d, Federico García^e, Cristina Tural^f, Àngels Jaén^g, Gemma Navarro^h, Á. Holguín^{a,*}, on behalf of the Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS)

^a FiBIO-IRYCIS (Hospital Ramón y Cajal) and CIBER-ESP, Madrid, Spain

^b Centro Nacional de Epidemiología, Madrid, Spain

^c Centro Sanitario Sandoval, Madrid, Spain

^d Hospital Carlos III, Madrid, Spain

^e Hospital San Cecilio, Granada, Spain

^f Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^g Hospital Mutua Terrassa, Terrassa, Spain

^h Corporació Parc Taulí, Sabadell, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2010

Received in revised form 13 October 2010

Accepted 29 October 2010

Keywords:

HIV-1 non-B subtypes

Subtyping tools

Phylogenetic analysis

Recombinants

ABSTRACT

Background: HIV-1 group M is classified into 9 subtypes and recombinants (CRFs/URFs). Variants other than subtype B (non-B) cause 90% of infections worldwide. HIV is often subtyped using automated tools instead of the gold-standard phylogenetic analysis. We evaluated the reliability of subtyping tools vs. phylogeny in a panel of HIV-1 *pol* sequences from the cohort of naïve patients of the HIV/AIDS Spanish Research Network (CoRIS).

Methods: HIV-1 subtyping was performed using seven automated subtyping tools (Stanford, Geno2pheno, Rega, NCBI, EuResist, STAR, TherapyEdge) in HIV-1 *pol* sequences from 670 CoRIS patients previously subtyped by phylogeny (587 subtype B/83 non-B). Sensitivity with respect to phylogeny was assessed.

Results: Most tools correctly classified subtype B, although up to 15% of non-B sequences were wrongly identified as B depending on the tool. For subtype B and CRF02_AG identification, Stanford/NCBI and Geno2pheno/Rega presented the highest/lowest sensitivities, respectively. EuResist and Geno2pheno correctly classified all 13 non-B “pure” subtypes at *pol*. The efficacy of all subtyping tools dropped clearly when identifying recombinants different from CRF02_AG. Only NCBI05, Rega and STAR identified URF, but with very low sensitivities. NCBI classified the highest number of subtypes B as non-B, and overestimated recombinants, especially when including references of 2009.

Conclusions: Automated tools are useful for subtype B identification, although they present serious limitations in classifying variants uncommon in developed regions, especially recombinants. Their sensitivity depends on the prevalence of non-B variants in the population, and decreases drastically when the frequency of recombinants increases. Furthermore, HIV-1 variant distribution differs according to the tool used.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been divided in four groups: M (main), O (outlier), N (non-M, non-O) and the recently identified P (Plantier et al., 2009). Most variants are included in group M, which is subdivided into 9 subtypes

(A–D, F–H, J, K), at least 45 circulating recombinant forms (CRFs) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>) and multiple unique recombinant forms (URFs). URFs are widely spread throughout the world, with different recombination breakpoints from those found in CRFs. The global distribution of HIV-1 clades is unequal. Subtype B only accounts for around 10% of the total infections worldwide (Hemelaar et al., 2006), but is prevalent in developed countries, including Western Europe and North America. Thus, most clinical and biological studies are based on this clade. The remaining subtypes and the recombinant forms (grouped as “non-B” variants) have been studied less, even though they cause about 90% of the estimated 33 million HIV

* Corresponding author at: HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Department of Microbiology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Ctra. Colmenar Viejo km. 9,100, 28034 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3368330; fax: +34 91 3368809.

E-mail address: aholguin.hcii@salud.madrid.org (Á. Holguín).

infections. Among them, subtypes C and A and recombinants CRF01_AE and CRF02_AG are responsible for nearly 70% of all HIV infections. HIV-1 molecular epidemiology studies have revealed an increasing prevalence of non-B subtypes and recombinants in developed countries in the last decade (Wensing et al., 2005; Sagir et al., 2007; Yerly et al., 2007; Frange et al., 2008; Holguín et al., 2008a). In Spain, non-B variants have been increasing among newly diagnosed HIV-1 natives and immigrants in the last years, and their current prevalence is about 15% (Holguín et al., 2008a; Cuevas et al., 2009; De Mendoza et al., 2009), although it is higher when the surveillance studies include a larger immigrant population.

In addition to the epidemiological impact, the presence of non-B subtypes and recombinants has implications for the diagnosis (Candotti et al., 2000), the viral load quantification (Gottesman et al., 2004; Kim et al., 2007; Rouet et al., 2007, 2010; Steegen et al., 2007; Holguín et al., 2008b; Korn et al., 2009; Wirdein et al., 2009), the vaccine design (Zhang et al., 2010), the progression to AIDS (Vasan et al., 2006; Baeten et al., 2007) and the cognitive impairment (Sacktor et al., 2009). The genetic peculiarities of non-B variants (Kantor and Katzenstein, 2003; Yebra et al., 2010) could affect the emergence of resistance (Grossman et al., 2004; Gonzalez et al., 2008), the viral replicative capacity (Holguín et al., 2006), the genetic barrier of certain drugs (Van de Vijver et al., 2005), the drug-binding affinity (Kinomoto et al., 2005) and the reliability of algorithms of genetic resistance interpretation (Snoeck et al., 2006; Champenois et al., 2008; Yebra et al., 2010). Thus, a proper detection and description of HIV-1 variants in representative cohorts are of clinical importance. Phylogenetic analysis (phy) is the gold standard method for subtyping and discrimination between subtypes and/or CRFs. However, it is not widely implemented in clinical settings because of its complexity. Several automated subtyping tools have been developed for HIV-1 classification in the clinical routine. They are fast and easy to use, and most are free-of-charge. However, they have considerable limitations vs. phy that confound their results especially in the analysis of non-B variants (Smith et al., 2005; Holguín et al., 2008c,d; Ntemgwa et al., 2008; Galán et al., 2009; Wilkinson and Engelbrecht, 2009; Yebra et al., 2010). Furthermore, the results of different tools are usually in disagreement (Gifford et al., 2006; Loveday and MacRae, 2006), especially in the analysis of recombinants.

The objective of the present study was to assess the sensitivity and specificity of seven subtyping tools (Stanford, Rega, Geno2pheno, NCBI, STAR, EuResist and TherapyEdge) in classifying a panel of HIV-1 *pol* sequences (587 subtype B/83 non-B) subtyped by phy from 670 different patients included in CoRIS, a large cohort of HIV-infected treatment-naïve patients in Spain.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The Spanish cohort of ARV-naïve HIV-infected patients included in the Research Network on HIV/AIDS (CoRIS) is a multicenter, hospital-based prospective cohort of subjects over 13-years-old seen at 31 hospitals of the 19 Autonomous Regions in Spain from January 2004. This study was approved by a review board and Ethical Committee of the CoRIS Cohort. It was designed to protect the rights of all subjects involved under the appropriate local regulations. About 60% of these patients have started ARV therapy and more than 30% of subjects are immigrants (Caro-Murillo et al., 2007). Out of the 670 patients included in this study, 375 (56%) were Spanish, 181 (27%) were immigrants (118 Central and South Americans, 17 Sub-Saharan Africans, 16 West Europeans,

11 East Europeans, 10 North Africans, 6 North Americans and 3 Asians) and 114 were of unknown origin. Basal *pol* sequences in fasta format were collected including the complete protease (PR) (codons 1–99) and part of the reverse transcriptase (RT) (codons 38–260 or 1–335) from the 670 naïve patients with available sequence.

2.2. HIV-1 variants identified by phy

HIV-1 subtypes and CRF were identified by phylogenetic analysis (phy) of the 670 *pol* sequences. The 2008 version of the subtype reference dataset provided by Los Alamos National Laboratory (available at: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) was used. It was updated including more sequences of CRF absent or scarcely represented (26_AU, 30.0206, 32.06A1, 34.01B, 38_BF, 41_CD and 42_BF). Therefore, at least two representative sequences of each 9 subtypes and the 43 CRF of HIV-1 group M available at the moment of the analysis were taken as references. The tree topology was obtained using the Neighbor-Joining method. DNA sequences were aligned using the ClustalX 2.0.11 program. The pairwise distance matrix was estimated using the Kimura two-parameter model within the DNADIST program, as implemented in the PHYLIP software package. Bootstrap re-sampling (1000 data sets) of the multiple alignments was performed, with the bootstrap cut-off set at 700. Out of the 670 sequences, 587 (87.6%) were subtype B, and 83 (12.4%) non-B variants. Only 13 (15.7%) were “pure” non-B subtypes: 1 A1, 3C, 4 F1, 4 F2, and 1 G. The remaining 70 (84.3%) non-B were recombinant. Forty-seven (67.1%) clustered with 12 different CRFs (1 CRF01_AE, 31 CRF02_AG, 2 CRF03_AB, 1 CRF06_cpx, 1 CRF11_cpx, 1 CRF12_BF, 4 CRF14_BG, 1 CRF15_01B, 2 CRF19_cpx, 1 CRF20_BG, 1 CRF28_BF, 1 CRF42_BF) and 23 were URF. They did not cluster to any known subtype/CRF, and presented complex mosaic patterns, including fragments from 8 different subtypes (A, B, C, D, F, G, J and K) and 3 different CRF (01_AE, 02_AG and 03_AB). In more detail, they carried B/CRF02_AG sequences (17.4%), A1/CRF03_AB (13%), B/A1/CRF03_AB (13%), B/F1 (8.7%), B/A1 (8.7%) or others (39.1%).

2.3. Automated HIV-1 subtyping tools

HIV-1 subtyping by seven automated tools was also assessed using all sequences. Six were free-of-charge and available online: Stanford HIVdb 6.0.5, Geno2pheno 3.0, Rega 2.0, NCBI (including both 2005 and 2009 reference sets), EuResist 2009, STAR 2006; however TherapyEdge-HIV 2009 was a commercial tool. They were available at: http://hivdb.stanford.edu/pages/alg/sierra_sequence.html (HIV-1 Drug Resistance Database; Stanford University, Palo Alto, CA); <http://www.geno2pheno.org> (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany); <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html> (Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgium); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi> (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD); http://engine.euresist.org/data_analysis/viral_sequence/new (EuResist Project, Rome, Italy); <http://www.vgb.ucl.ac.uk/starn.shtml> (UCL Division of Infection and Immunity, Royal Free & University College Medical School, London, UK) and <http://www.therapyedge.com> (TherapyEdge-HIV, ABL, Luxembourg). A discrepancy was considered when the tool assigned a different HIV-1 subtype/CRF than phy. For NCBI tool, we used two different reference sequences' sets (2005 and 2009) in the analysis, because NCBI09 included 22 more CRFs than NCBI05.

Table 1Sensitivity of the automated subtyping tools vs. phy in the 670 HIV-1 *pol* sequences classification.

HIV-1 variants (no.)	% Sensitivity (95% CI)							
	Stanford 6.0.5	Rega 2.0	Geno2pheno 3.0	TherapyEdge 2009	STAR 2006	EuResist 2009	NCBI 2005	NCBI 2009
Subtype B (587)	98.6 (98;99)	85.9 (83;89)	95.9 (94;97)	95.6 (94;97)	95.1 (93;97)	97.6 (96;99)	81.3 (78;84)	48.7 (45;53)
Non-B variants (83)	47 (36;58)	48.2 (37;59)	59 (48;70)	55.4 (45;66)	50.6 (40;61)	57.8 (47;68)	54.2 (43;65)	16.9 (9;53)
Pure non-B subtypes (13)	76.9 (54;100)	92.3 (78;100)	100	92.3 (78;100)	84.6 (65;100)	100	76.9 (54;100)	53.8 (27;81)
CRF02_AG (31)	90.3 (80;100)	71 (55;87)	93.5 (85;100)	83.9 (71;97)	83.9 (71;97)	87.1 (75;99)	77.4 (63;92)	9.7 (–1;20)
CRF non-02_AG (16)	6.2 (–6;18)	12.5 (–4;29)	43.75 (19;68)	50 (25;74)	6.2 (–6;18)	50 (25;74)	31.2 (8;54)	25 (4;46)
URF (23)	0	17.4 ^a (2;33)	0	0	17.4 ^a (2;33)	0	26.1 (8;44)	0
Total (670)	77.3 (74;80)	81.2 (78;84)	91.3 (89;93)	90.6 (88;93)	89.5 (87;92)	92.7 (91;95)	77.9 (75;81)	44.8 (41;48)

No., number of sequences; CI, confidence interval; CRF, circulating recombinant form; URF, unique recombinant form; Phy, phylogenetic analysis. We considered as correct classification when the subtyping tool assigned the same HIV-1 subtype or CRF as that provided by phylogenetic analysis for each *pol* sequence. Pure non-B subtypes included: 1 A1, 3C, 4 F1, 4 F2 and 1 G. CRF non-02_AG included: 1 CRF01_AE, 2 CRF03_AB, 1 CRF06_cpx, 1 CRF11_cpx, 1 CRF12_BF, 4 CRF14_BG, 1 CRF15_01B, 2 CRF19_cpx, 1 CRF20_BG, 1 CRF28_BF and 1 CRF42_BF (see Table 2). Complex recombinants or URFs not ascribed to any HIV-1 subtype or circulating recombinant (CRF) were defined using a bootscanning method (Simplot) (Yebra et al., unpublished data).

^a All the URFs whose mosaic patterns were correctly identified by Rega and STAR (4/23 each) were, however, unassigned by each tool.

2.4. Statistical analysis

Sensitivity and specificity were obtained using a calculator available at: http://www.hrc.es/investigacion/bioest/otras_calculadoras.html.

3. Results

3.1. Different sensitivities of automated subtyping tools for HIV-1 variant identification

3.1.1. In the complete cohort

The sensitivity of the seven automated tools for HIV-1 identification when compared to phy differed among HIV-1 variants and tools. Including our entire study cohort ($n=670$) with predominance of clade B (87.6%), sensitivity exceeded 90% for Geno2pheno, EuResist and TherapyEdge. However, when only the 83 HIV-1 non-B subtypes and recombinants were included, Geno2pheno, EuResist, TherapyEdge and NCBI05 only identified about 55% of them (Table 1). The remaining tools identified a half at best. Of note, a high rate (9.3% and 17.2%, respectively) of the 670 *pol* sequences was not assigned to any subtype/recombinant using STAR and Rega. STAR unassigned 33 (40%) non-B variants and 83 (14.1%) subtypes B and Rega 32 (38.5%) non-B variants and 29 (4.9%) subtypes B. Stanford and TherapyEdge provided the subtype at PR and RT separately, even when the complete *pol* (PR and RT) in one file was used. Stanford provided very similar sensitivities for HIV-1 variant detection in PR/RT meanwhile TherapyEdge subtyped RT slightly better than PR (data not shown).

3.1.2. In HIV-1 pure subtypes

For subtype B ($n=587$) identification, Stanford presented the highest sensitivity (98.6%) and only misclassified 6 subtypes B (Table 1), but only in PR and not in RT. The specificity of subtyping tools was also high, ranging from 84.3% (Geno2pheno) to 100% (Rega). However, we observed misclassifications. In fact, all rapid subtyping tools, except Rega and STAR, identified as non-B variants from 1.4% (Stanford) to 51.3% (NCBI09) of the 587 subtype B sequences defined by phy. NCBI presented the highest overestimation of non-B variants, since it only correctly classified 71.3% or 48.7% of the subtype B sequences defined by phy when the 2005 or 2009 versions were used, respectively (Table 1). In the remaining cases, NCBI included regions of other subtypes or CRF besides subtype B, especially in the case of NCBI09.

For non-B pure subtypes ($n=13$, including A1, C, F1, F2 and G), the rate of correct identifications was high as well. EuResist and Geno2pheno correctly classified all of them. The sensitivity was 77–92% in the remaining tools (Table 1). The specificity was

also high (>99%) in most cases. Of note, among the 24 sequences misclassified by Geno2pheno, 19 were assigned to subtype D. TherapyEdge provided 4.4% of false non-B variants, 11 of them subtyped as D^{PR}/B^{RT}. Thus, Geno2pheno and TherapyEdge could overestimate subtype D, which has been demonstrated to have a faster progression to AIDS and a higher pathogenicity (Vasan et al., 2006; Baeten et al., 2007; Sacktor et al., 2009).

3.1.3. In HIV-1 recombinant forms: CRFs and URFs

All subtyping tools presented a high sensitivity for CRF01_AE and CRF02_AG detection, although 7–29% of the 31 CRF02_AG were underestimated using subtyping tools excluding NCBI09, which presented important limitations in detecting both variants (Table 1). The specificity for CRF01_AE and CRF02_AG was very high, ranging from 98.4% (EuResist) to 100% (NCBI05) and 99.7% (EuResist) to 100% (Rega and NCBI09), respectively.

However, the efficacy of all subtyping tools clearly dropped when identifying recombinants different from CRF02_AG (Table 2). Among the 15 *pol* sequences ascribed by phy to 10 different CRFs non-CRF01_AE, non-CRF02_AG, automated tools failed to detect most of them, although EuResist, TherapyEdge, and Geno2pheno provided the best results (Table 1).

Regarding the identification of the complex recombinant mosaics or URF ($n=23$) previously characterized in our cohort by phylogenetic analysis and bootscanning, only NCBI05, Rega and

Table 2

Subtyping of HIV-1 recombinant forms by automated tools.

HIV-1 recombinants by phy (no.)	Correct identifications (no.) by each subtyping tool vs. phy
CRF01_AE (1)	EuR, G2p, NCBI05, Rega, Stanf, STAR, and TE (1)
CRF02_AG (31)	G2p (29); Stanf (28); EuR (27); STAR and TE (26); NCBI05 (24); Rega (22); NCBI09 (3)
CRF03_AB (2)	None
CRF06_cpx (1)	EuR, G2p and TE (1)
CRF11_cpx (1)	TE (1)
CRF12_BF (1)	G2p, NCBI05, Rega and TE (1)
CRF14_BG (4)	EuR, G2p (4); NCBI05, NCBI09 and TE (3)
CRF15_01B (1)	NCBI05 (1)
CRF19_cpx (2)	EuR (2); TE (1)
CRF20_BG (1)	NCBI09 (1)
CRF28_BF (1)	None
CRF42_BF (1)	None
URF (23)	NCBI05 (6); Rega and STAR (4)

No., number of sequences; CRF, Circulating Recombinant Form; URF, Unique Recombinant Form; EuR, EuResist 2009; G2p, Geno2pheno 3.0; Stanf, Stanford-HIVdb 6.0.5; TE, TherapyEdge-HIV 2009; NCBI05 and NCBI09, versions with reference datasets of 2005 and 2009 respectively; Rega, Rega version 2.0; STAR, STAR version 2006.

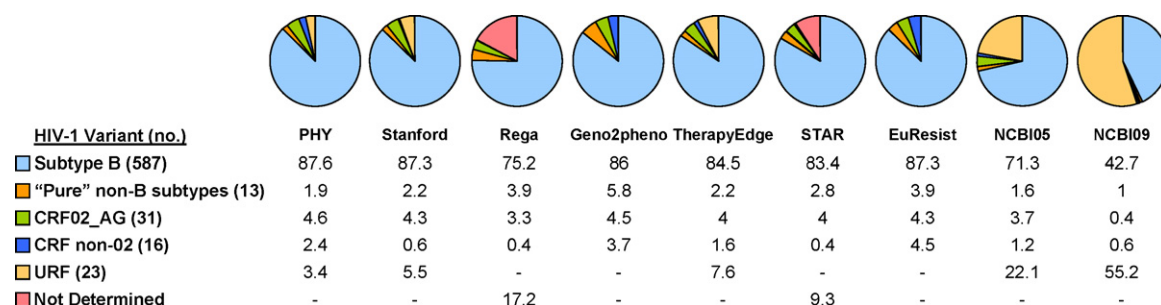


Fig. 1. Distribution of HIV-1 variants in the CoRIS cohort according to each subtyping method. PHY, phylogenetic analysis considered the gold standard method to classify HIV-1; no., number of sequences; CRF, circulating recombinant forms; URF, unique recombinant forms. The automated tools included were: Stanford HIVdb 6.0.5, Rega 2.0, Geno2pheno 3.0, TherapyEdge-HIV 2009, STAR 2006, EuResist 2009 and NCBI (including both set of references from 2005 and 2009). Stanford and TherapyEdge provided independent results for protease and reverse transcriptase, and the cases with different results in the two regions were considered as URF. For NCBI, the *pol* sequences including regions ascribed to different HIV-1 subtypes and/or CRF were considered as URF.

STAR were capable of identifying URF, but with very low sensitivities (Table 1). Rega and STAR unassigned 15 and 16 of the 23 URF, respectively, and the remaining URF were wrongly classified as pure subtypes or CRF using both tools. Nevertheless, Rega correctly showed the subtypes involved in the recombinants in 4 unassigned URF (2 URF_BF1, 1 BA1, 1 BC) and so did STAR in 4 other unassigned URF (3 URF_B02, 1 BC). On the other hand, NCBI05 correctly detected 6 URF (3 URF_02B, 1 03B, 1 BG02 and 1 BC). The URF_BC was the only one correctly identified by the three tools.

3.2. HIV-1 non-B variants identified as subtype B by automated subtyping tools

A considerable rate (1–16%) of the 83 non-B variants by phy was wrongly identified as subtype B by automated subtyping tools, with the exception of NCBI09 and Rega (Table 2). Among the 83 non-B variants, Geno2pheno identified as subtype B 16% of cases, EuResist 14%, TherapyEdge 6%, Stanford 5% and STAR and NCBI05, 1%. Therefore, Geno2pheno and EuResist presented the highest overestimation of subtype B, and NCBI and Rega the lowest.

3.3. HIV-1 variant distribution in CoRIS according to the subtyping tool

The distribution of HIV-1 subtypes and recombinants among the 670 patients from CoRIS was different according to each tool (Fig. 1). In STAR and Rega, a high rate (9 and 17%, respectively) of sequences was not assigned to any subtype/CRF. The differences between tools were especially pronounced in CRFs non-02_AG: present in 2.4% of patients according to phy, but $\leq 0.6\%$ for STAR, Stanford and Rega, and almost fivefold for EuResist. Finally, although URF represented only 3.4% of cohort by phy, this estimation was 55.2% for NCBI09 and 22.1% for NCBI05. For TherapyEdge and Stanford, different results in PR and RT were considered as URF (7.6% and 5.5%, respectively).

4. Discussion

4.1. Reliability of automated subtyping tools

HIV-1 subtyping is of clinical importance, as previously mentioned. The correct identification of non-B variants is important due to their high prevalence in pandemics and their increasing rate in industrialized countries by population movements from areas where non-B variants are epidemic (Wensing et al., 2005; Yerly et al., 2007; Holguín et al., 2008a). In fact, a third of newly HIV-diagnosed cases in Spain are immigrants (Caro-Murillo et al., 2009). Since the HIV/AIDS pandemic tends to constantly grow in complexity (Zhang et al., 2010) by the increasing spread of CRF and URF favored by coinfections and/or superinfections, the expan-

sion of recombinant viruses has complicated the HIV-1 subtyping. Thus, an improvement in complex recombinant variants detection is strongly recommended. Phylogeny (phy) is considered the gold-standard method for HIV subtyping. However, since it can be laborious and complex, automated tools have been developed. Although useful for subtype B identification, they present limitations (Smith et al., 2005; Gifford et al., 2006; Loveday and MacRae, 2006; Ntemgwa et al., 2008; Galán et al., 2009; Wilkinson and Engelbrecht, 2009; Yebra et al., 2010).

This study compared the sensitivity of seven widely used HIV-1 subtyping tools [Stanford, Geno2pheno, Rega, NCBI (2005 and 2009 versions), EuResist, STAR and TherapyEdge] with respect to phy in the identification of subtypes and recombinants in a large and representative Spanish HIV-infected Cohort (CoRIS). To our knowledge, this work includes the highest numbers of tools, HIV-1 sequences and different CRFs among the studies which compare results of automated tools with phylogeny (Table 3).

We have shown that the sensitivity of certain automated subtyping tools (especially EuResist and Geno2pheno) in large cohorts of HIV-1 infected patients can be very high if subtype B is predominant, as in our cohort. This good sensitivity is due to the overrepresentation of subtype B in the databases because of its dominance in the HIV epidemic in developed countries, where more *pol* sequences are routinely available for resistance testing (Table 3). However, we observed important failures in the subtype B identification for specific tools. Most of the automated subtyping tools provided, to a greater or lesser extent, false subtype B among the non-B sequences, overestimating the rate of subtype B isolates in a given population. In more detail, between 10 and 15% of non-B sequences were identified as subtype B when using Geno2pheno, EuResist, and the separate analysis of PR and RT by Stanford and TherapyEdge.

For pure non-B subtypes identification, the best tools were also Geno2pheno and EuResist (sensitivity 100%). Previous reports have also described specific limitations in pure non-B subtypes identification using online subtyping tools. For instance, subtype D was usually underestimated using Rega (Gifford et al., 2006; Holguín et al., 2008c) but overestimated using Geno2pheno, Stanford (Galán et al., 2009) and TherapyEdge due to its confusion with subtype B especially in the PR, as our study confirmed. The misclassification of subtype D is of special relevance because this variant seems to be more pathogenic than others (Vasan et al., 2006; Baeten et al., 2007; Sacktor et al., 2009). An inadequate detection of subtype G by STAR (Gifford et al., 2006), subtype J by Rega (Gifford et al., 2006; Holguín et al., 2008c) and subtype A by Stanford (Gifford et al., 2006) has also been published.

Focusing on recombinant variants, our data demonstrate that the sensitivity of the automated tools decreases drastically when there is an increase in non-B recombinants other than CRF01_AE

Table 3
Studies of the limitations of automated subtyping tools which include sequences of HIV-1 non-B variants.

Author	Country	Number of HIV-1 sequences analyzed (number of different variants)	Viral region	Subtyping method included										
				Phy	Stanford	Rega	Geno2pheno	Therapy Edge	STAR	EuResist	NCBI	jpHMM	LANL	Virco
Present study	Spain	83 non-B sequences (5 subtypes, 12 CRF) 587 subtype B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Yebra et al. (2010)	Spain	128 non-B (6 subtypes, 11 CRF) 226 subtype B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Wilkinson and Engelbrecht (2009)	South Africa	10 non-B (3 subtypes, 7 URF) 1 subtype B	Nearly full genome	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Galán et al. (2009)	Spain	56 non-B (5 subtypes, 8 CRF, 11 URF, 3 U) 14 subtype B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Holguín et al. (2008c)	Spain	277 PR/171 RT non-B (8 subtypes, 9 CRF) 33 subtype B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Holguín et al. (2008d)	Spain	5 non-B (1 CRF, 4 URF)	Nearly full genome	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ntemgwa et al. (2008)	Canada	4 sequences of the same URF	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Loveday and MacRae (2006)	UK	1,002 non-B and B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Gifford et al. (2006)	UK	10,503 PR/10,476 RT non-B and B	Pol	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Smith et al. (2005)	UK	81 non-B (5 subtypes, 2 CRF) 19 subtype B	Env	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

UK, United Kingdom; PR, protease; RT, reverse transcriptase; Pol, region including complete PR and partial RT; U, unclassified; CRF, circulating recombinant form; Ref, corresponding reference; Phy, phylogenetic analysis (the gold standard method to classify HIV variants); jpHMM, jumping profile Hidden Markov Model (available at: <http://jpHMM.gobics.de>); LANL, Los Alamos National Laboratory RIP or BLAST tools (available at: <http://www.hiv.lanl.gov>). The "tick" symbol indicates the inclusion of the corresponding subtyping method in each study.

and CRF02_AG, as they are absent or scarcely represented in the databases of these tools. For instance, neither STAR nor Stanford could subtype any single CRF other than 01_AE and 02_AG (Table 2), reflecting the lack of sufficient sequences in their databases. Regarding URFs, subtyping tools were inefficient in their detection. Only NCBI05, Rega and STAR were capable of identify URF, but with very low sensitivity. Our study presents a low number of non-01, non-02 CRFs ($n = 15$), due to their low prevalence in Spain, which is probably insufficient to extract a conclusion with statistical support. However, our results agree with other studies (Holguín et al., 2008c; Galán et al., 2009; Yebra et al., 2010), and the presented data could be very useful in countries where complex recombinants are more frequent.

In addition, our data reveals that the HIV-1 subtype distribution in any study cohort is different according to the automated subtyping tool used. In other words, the results of a molecular epidemiology study would change depending on the tool used and on the prevalence of non-B variants, especially recombinants (Fig. 1).

4.2. Technical differences among subtyping tools

The described discrepancies between various automated tools vs. phy could be explained by differences in both the subtyping methods applied and the reference datasets included. HIV-1 variants were defined by phy using the Neighbor-Joining (NJ) method. Among the automated tools assessed here, only Rega was based on phylogeny, also applying NJ combined with bootscanning. However, this tool has a threshold which prevents the assignation of a subtype/CRF when it does not obtain enough statistical support. This restricts its efficacy despite using phylogeny. It is remarkable that the highest sensitivity was obtained by tools which performed a simple BLAST search, assigning to the query sequence the subtype/CRF of the most similar reference in their databases (Geno2pheno, EuResist, TherapyEdge, Stanford and NCBI). In particular, NCBI uses a sliding-window along the query sequence and each window is compared to the references by BLAST. However, this sliding-window causes an overestimation of recombination, magnified when more reference sequences are included as we reported comparing 2005 vs. 2009 versions. With this method, the inclusion of multiple references which share similarity confounded the results instead of improving them. In several cases when NCBI05 assigned a specific subtype/CRF, NCBI09 provided a mixture of subtypes/CRFs with common regions. Some CRFs are very close and difficult to discriminate in the studied region and it is thus extremely difficult to obtain reliable results with systems based on Blast analysis. In contrast, STAR is a statistical method that uses position-specific scoring matrices of each subtype to perform profile subtype alignments. But, as well as Rega, there are many cases where STAR does not assign any subtype if the assignment's *P*-score does not reach the threshold. The different reference sets used by each tool are also important in the discrepancies. Meanwhile STAR and Stanford excluded any CRF different from CRF01_AE and CRF02_AG, Rega and Geno2pheno included up to CRF14_BG and TherapyEdge up to CRF19_cpx. Only NCBI09 includes references of the CRFs as they are described (at the moment of the analyses, there were 45 different CRFs).

4.3. Important considerations

Several main considerations should be considered for understanding the incorrect HIV-1 subtyping using automated subtyping tools in a given population. First, the rate of non-B variants in the study cohort; second, the rate of recombinants other than CRF01_AE and CRF02_AG among these non-B variants; third, the automated tool used for subtyping; fourth, the rate of non-B variants wrongly identified as subtype B and vice versa, which underestimates the

prevalence of non-B or B variants; fifth, the high rate of sequences (especially non-B) unassigned in the cases of STAR and Rega.

Thus, our data reveals that subtyping tools should be regularly updated as is done for resistance mutations before their use in routine clinical settings by increasing the number of non-B/CRF sequences to improve their detection. In light of our results, when the use of phylogenetic analysis is not available we would suggest EuResist, Geno2pheno and/or TherapyEdge as the best subtyping tools for cohorts with predominance of clade B as in our cohort. Despite the great specificity of Rega and STAR for subtype B, too many sequences were unassigned. On the other hand, in areas where non-B variants and especially recombinant forms are prevalent, none of the tools evaluated here would be sufficiently reliable. In these cases, the use of several subtyping tools instead of just one is recommended in order to compare their results. HIV-1 subtypes and predominant recombinants need to be identified with tools providing high specificities and sensitivities and subsequent phylogenetic analysis is recommended on samples that cannot be classified.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI06/0025) and the AIDS Research Network of the Carlos III National Institute of Health (ISCIII-RETIC RD 06/006). G.Y. is supported by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (FSE). AH is supported by Agencia Laín Entralgo.

We would like to thank all the Centers and Researchers participating in CoRIS:

Steering committee: Juan Berenguer, Julia del Amo, Federico García, Félix Gutiérrez, Pablo Labarga, Santiago Moreno, María Ángeles Muñoz.

Data management and statistical analyses: Ana María Caro-Murillo, Paz Sobrino Vegas, Santiago Pérez-Cachafeiro, Victoria Hernando Sebastián, Belén Alejos Ferreras, Débora Álvarez, Mónica Trastoy.

BioBank: M. Ángeles Muñoz-Fernández, Isabel García-Merino, Coral Gómez Rico, Jorge Gallego de la Fuente, Almudena García Torre.

Centers:

Hospital General Universitario de Alicante (Alicante): Joaquín Portilla Sogorb, Esperanza Merino de Lucas, Sergio Reus Bañuls, Vicente Boix Martínez, Livia Giner Oncina, Carmen Gadea Pastor, Irene Portilla Tamarit, Patricia Arcaina Toledo. *Hospital Universitario de Canarias (Santa Cruz de Tenerife):* Juan Luis Gómez Sirvent, Patricia Rodríguez Fortúnez, María Remedios Alemán Valls, María del Mar Alonso Socas, Ana María López Lirola, María Inmaculada Hernández Hernández, Felicitas Díaz-Flores. *Hospital Carlos III (Madrid):* Vicente Soriano, Pablo Labarga, Pablo Barreiro, Carol Castañares, Pablo Rivas, Andrés Ruiz, Francisco Blanco, Pilar García, Mercedes de Diego. *Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo):* Víctor Asensi, Eulalia Valle, José Antonio Cartón. *Hospital Clinic (Barcelona):* José M. Miró, María López-Diéguez, Christian Manzardo, Laura Zamora, Iñaki Pérez, M^a Teresa García, Carmen Ligeró, José Luis Blanco, Felipe García-Alcaide, Esteban Martínez, Josep Mallolas, José M. Gatell. *Hospital Doce de Octubre (Madrid):* Rafael Rubio, Federico Pulido, Silvana Fiorante, Jara Llenas, Violeta Rodríguez, Mariano Matarranz. *Hospital Donostia (San Sebastián):* José Antonio Iribarren, Julio Arrizabalaga, María José Aramburu, Xabier Camino, Francisco Rodríguez-Arrondo, Miguel Ángel von Wichmann, Lidia Pascual Tomé, Miguel Ángel Goenaga, María Jesús Bustinduy, Harkaitz Azkune Galparsoro. *Hospital General Universitario de Elche (Elche):* Félix Gutiérrez, Mar Masiá, José Manuel Ramos, Sergio Padilla, Andrés Navarro, Fernando Mon-

tolio, Yolanda Peral, Catalina Robledano García. *Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona):* Bonaventura Clotet, Cristina Tural, Lidia Ruiz, Cristina Miranda, Roberto Muga, Jordi Tor, Arantza Sanvisens. *Hospital Gregorio Marañón (Madrid):* Juan Berenguer, Juan Carlos López Bernaldo de Quirós, Pilar Miralles, Jaime Cosín Ochaíta, Matilde Sánchez Conde, Isabel Gutiérrez Cuellar, Margarita Ramírez Schacke, Belén Padilla Ortega, Paloma Gijón Vidaurreta. *Hospital Universitari de Tarragona Joan XXIII, IISPV, Universitat Rovira i Virgili (Tarragona):* Francesc Vidal, Joaquín Peraire, Consuelo Viladés, Sergio Veloso, Marta Sanjuán, Montserrat Vargas, Miguel López-Dupla, Montserrat Olona, Alba Aguilar, Joan Joseph Sirvent, Antoni Soriano, Rami AA. Qaneta. *Hospital Universitario La Fe (Valencia):* José López Aldegue, Marino Blanes Juliá, José Lacruz Rodrigo, Miguel Salavert, Marta Montero, Eva Calabuig, Sandra Cuéllar. *Hospital Universitario La Paz (Madrid):* Juan González García, Ignacio Bernardino de la Serna, José María Peña Sánchez de Rivera, Marta Mora Rillo, José Ramón Arribas López, María Luisa Montes Ramírez, José Francisco Pascual Pareja, Blanca Arribas, Juan Miguel Castro, Fco Javier Zamora Vargas, Ignacio Pérez Valero. *Hospital de la Princesa (Madrid):* Ignacio de los Santos, Jesús Sanz Sanz, Johana Rodríguez, Ana Salas Aparicio, Cristina Sarriá Cepeda. *Hospital San Pedro-CIBIR (Logroño):* José Antonio Oteo, José Ramón Blanco, Valvanera Ibarra, Luis Metola, Mercedes Sanz, Laura Pérez-Martínez. *Hospital San Pedro II (Logroño):* Javier Pinilla Moraza. *Hospital Universitario Mutua de Terrassa (Terrassa):* David Dalmau, Angels Jaén Manzanera, Mireia Cairó Llobell, Daniel Irigoyen Puig, Laura Ibáñez, Queral Jordano Montañez, Mariona Xercavins Valls, Javier Martínez-Lacasa, Pablo Velli, Roser Font. *Hospital de Navarra (Pamplona):* Julio Sola Boneta, Javier Uriz, Jesús Castiello, Jesús Reparaz, María Jesús Arraiza, Carmen Irigoyen, David Mozas. *Hospital Parc Taulí (Sabadell):* Ferrán Segura, María José Amengual, Eva Penelo, Gemma Navarro, Montserrat Sala, Manuel Cervantes, Valentín Pineda. *Hospital Ramón y Cajal (Madrid):* Santiago Moreno, José Luis Casado, Fernando Dronda, Ana Moreno, María Jesús Pérez Elías, Dolores López, Carolina Gutiérrez, Beatriz Hernández, María Pumares, Paloma Martí. *Hospital Reina Sofía (Murcia):* Alfredo Cano Sánchez, Enrique Bernal Morell, Ángeles Muñoz Pérez. *Hospital San Cecilio (Granada):* Federico García García, José Hernández Quero, Alejandro Peña Monje, Leopoldo Muñoz Medina, Jorge Parra Ruiz. *Centro Sanitario Sandoval (Madrid):* Jorge del Romero Guerrero, Carmen Rodríguez Martín, Teresa Puerta López, Juan Carlos Carrió Montiel. *Hospital Universitario Santiago de Compostela (Santiago de Compostela):* Antonio Antela, Arturo Prieto, Elena Losada. *Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca):* Melchor Riera, Javier Murillas, María Peñaranda, María Leyes, María Angels Ribas, Antoni Campins, Concepción Villalonga. *Hospital Universitario de Valme (Sevilla):* Juan Antonio Pineda, Eva Recio Sánchez, Fernando Lozano de León, Juan Macías, José del Valle, Jesús Gómez-Mateos, Rosario Mata. *Hospital Virgen de la Victoria (Málaga):* Jesús Santos González, Manuel Márquez Solero, Isabel Viciano Ramos, Rosario Palacios Muñoz. *Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla):* Pompeyo Viciano, Manuel Leal, Luis Fernando López-Cortés, Mónica Trastoy.

References

- Baeten, J.M., Chohan, B., Lavreys, L., Chohan, V., McClelland, R.S., Certain, L., Mandalia, K., Jaoko, W., Overbaugh, J., 2007. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J. Infect. Dis.* 195, 1177–1180.
- Candotti, D., Adu-Sarkodie, Y., Davies, F., Baldrich-Rubio, E., Stirrups, K., Lee, H., Allain, J.P., 2000. AIDS in an HIV-seronegative Ghanaian woman with intersubtype A/G recombinant HIV-1 infection. *J. Med. Virol.* 62, 1–8.
- Caro-Murillo, A.M., Castilla, J., Perez-Hoyos, S., Miró, J.M., Podzamczek, D., Rubio, R., Riera, M., Viciano, P., López Aldegue, J., Iribarren, J.A., de los Santos-Gil, I., Gomez-Sirvent, J.L., Berenguer, J., Gutiérrez, F., Saumoy, M., Segura, F., Soriano, V., Pena, A., Pulido, F., Oteo, J.A., Leal, M., Casabona, J., del Amo, J., Moreno, S., 2007. Spanish cohort of naive HIV-infected patients (CoRIS): rationale, organization and initial results. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25, 23–31.

- Caro-Murillo, A.M., Gutiérrez, F., Ramos, J.M., Sobrino, P., Miró, J.M., Lopez-Cortes, L.F., Tural, C., Moreno, A., Gil, I.D., Angoitia, J.M., Camino, X., Lletí, M.S., Rubio, R., Moreno, S., del Amo, J., CoRIS, 2009. HIV infection in immigrants in Spain: Epidemiological characteristics and clinical presentation in the CoRIS Cohort (2004–2006). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27, 380–388.
- Cuevas, M.T., Muñoz-Nieto, M., Thomson, M.M., Delgado, E., Iribarren, J.A., Cilla, G., Fernández-García, A., Santamaría, J.M., Lezaun, M.J., Jiménez, L., López-Soria, L.M., Sota, M., Contreras, G., Nájera, R., Pérez-Álvarez, L., 2009. HIV-1 transmission cluster with T215D revertant mutation among newly diagnosed patients from the Basque Country, Spain. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 51, 99–103.
- Champenois, K., Bocket, L., Deuffic-Burban, S., Cotte, L., André, P., Choisy, P., Yazdanpanah, Y., 2008. Expected response to protease inhibitors of HIV-1 non-B subtype viruses according to resistance algorithms. *AIDS* 22, 1087–1089.
- De Mendoza, C., Garrido, C., Poveda, E., Corral, A., Zahonero, N., Treviño, A., Anta, L., Soriano, V., 2009. Changes in drug resistance patterns following the introduction of HIV type 1 non-B subtypes in Spain. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 967–972.
- Frangé, P., Galimand, J., Vidal, N., Goujard, C., Deveau, C., Soula, F., Peeters, M., Meyer, L., Rouzioux, C., Chaix, M.L., 2008. New and old complex recombinant HIV-1 strains among patients with primary infection in 1996–2006 in France: the French ANRS CO06 primo cohort study. *Retrovirology* 5, 69.
- Galán, J.C., Aguilera, A., González-Alba, J.M., Rodríguez-Calviño, J.J., Moldes Suárez, L.M., Pérez-Elías, M.J., Regueiro, B., 2009. Can the rapid subtyping tools identify the increasing new HIV-recombinant forms? In: 7th European HIV Drug Resistance Workshop, Stockholm, Sweden.
- Gifford, R., de Oliveira, T., Rambaut, A., Myers, R.E., Gale, C.V., Dunn, D., Shafer, R., Vandamme, A.M., Kellam, P., Pillay, D., 2006. Assessment of automated genotyping protocols as tools for surveillance of HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 20, 1521–1529.
- Gonzalez, L.M., Santos, A.F., Abecasis, A.B., Van Laethem, K., Soares, E.A., Deforche, K., Tanuri, A., Camacho, R., Vandamme, A.M., Soares, M.A., 2008. Impact of HIV-1 protease mutations A71V/T and T74S on M89I/V-mediated protease inhibitor resistance in subtype G isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 1201–1204.
- Gottesman, B.S., Grosman, Z., Lorber, M., Levi, I., Shitrit, P., Mileguir, F., Gottesman, G., Chowder, M.Y., 2004. Measurement of HIV RNA in patients infected by subtype C by assays optimized for subtype B results in an underestimation of the viral load. *J. Med. Virol.* 73, 167–171.
- Grossman, Z., Paxinos, E.E., Averbuch, D., Maayan, S., Parkin, N.T., Engelhard, D., Lorber, M., Istomin, V., Shaked, Y., Mendelson, E., Ram, D., Petropoulos, C.J., Schapiro, J.M., 2004. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2159–2165.
- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20, w13–23.
- Holguín, Á., Sune, C., Hamy, F., Soriano, V., Klimkait, T., 2006. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J. Clin. Virol.* 36, 264–271.
- Holguín, Á., de Mulder, M., Yebra, G., López, M., Soriano, V., 2008a. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr. HIV Res.* 6, 327–334.
- Holguín, Á., López, M., Molinero, M., Soriano, V., 2008b. Performance of three commercial viral load assays, Versant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA bDNA v3.0, Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1, and NucliSens HIV-1 EasyQ v1.2, testing HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2918–2923.
- Holguín, Á., López, M., Soriano, V., 2008c. Reliability of rapid subtyping tools compared to that of phylogenetic analysis for characterization of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and recombinant forms. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3896–3899.
- Holguín, Á., Lospitao, E., López, M., de Arellano, E.R., Pena, M.J., del Romero, J., Martín, C., Soriano, V., 2008d. Genetic characterization of complex inter-recombinant HIV-1 strains circulating in Spain and reliability of distinct rapid subtyping tools. *J. Med. Virol.* 80, 383–391.
- Kantor, R., Katzenstein, D., 2003. Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev.* 5, 25–35.
- Kim, J.E., Beckthold, B., Chen, Z., Mihowich, J., Malloch, L., Gill, M.J., 2007. Short communication: identification of a novel HIV type 1 subtype H/J recombinant in Canada with discordant HIV viral load (RNA) values in three different commercial assays. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 1309–1313.
- Kinamoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, J.A., Yokoyama, M., Nii-Trebi, N., Ugly-Kwame, E., Sato, H., Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Barre-Sinoussi, F., Sata, T., Tokunaga, K., 2005. HIV-1 proteases from drug-naïve West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin. Infect. Dis.* 41, 243–251.
- Korn, K., Weissbrich, B., Henke-Gendo, C., Heim, A., Jauer, C.M., Taylor, N., Eberle, J., 2009. Single-point mutations causing more than 100-fold underestimation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) load with the Cobas TaqMan HIV-1 real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1238–1240.
- Loveday, C., MacRae, E., 2006. Limitations in using online tools to determine HIV-1 subtype in clinical patients: a comparison of 5 tools. *Antivir. Ther.* 11, S129.
- Ntemgwá, M., Gill, M.J., Brenner, B.G., Moisi, D., Wainberg, M.A., 2008. Discrepancies in assignment of subtype/recombinant forms by genotyping programs for HIV type 1 drug resistance testing may falsely predict superinfection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 995–1002.
- Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemee, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F., 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* 15, 871–872.
- Rouet, F., Chaix, M.L., Nerrienet, E., Ngo-Giang-Huong, N., Plantier, J.C., Burgard, M., Peeters, M., Damond, F., Ekouevi, D.K., Msellati, P., Ferradini, L., Rukobo, S., Marechal, V., Schvachsa, N., Wakrim, L., Rafalimanana, C., Rakotoambinina, B., Viard, J.P., Seigneurin, J.M., Rouzioux, C., 2007. Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA Quantification: usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 45, 380–388.
- Rouet, F., Foulongne, V., Viljoen, J., Steegen, K., Becquart, P., Valea, D., Danaviah, S., Segondy, M., Verhofstede, C., Van de Perre, P., 2010. Comparison of the generic HIV viral load assay with the Amplicor HIV-1 monitor v1.5 and Nuclisens HIV-1 EasyQ v1.2 techniques for plasma HIV-1 RNA quantitation of non-B subtypes: the Kesho Bora preparatory study. *J. Virol. Methods* 163, 253–257.
- Sacktor, N., Nakasujja, N., Skolasky, R.L., Rezapour, M., Robertson, K., Musisi, S., Katabira, E., Ronald, A., Clifford, D.B., Laeyendecker, O., Quinn, T.C., 2009. HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda. *Clin. Infect. Dis.* 49, 780–786.
- Sagir, A., Oette, M., Kaiser, R., Daumer, M., Fatkenheuer, G., Rockstroh, J.K., Knechten, H., Schmutz, G., Hower, M., Emmelkamp, J., Pfister, H., Haussinger, D., 2007. Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 843–848.
- Smith, M., Geretti, A.M., Osner, N., Easterbrook, P., Zuckerman, M., 2005. High levels of discordance between sequencing and serological subtyping in a predominantly non-B subtype HIV-1 infected cohort. *J. Clin. Virol.* 33, 312–318.
- Snoeck, J., Kantor, R., Shafer, R.W., Van Laethem, K., Deforche, K., Carvalho, A.P., Wynhoven, B., Soares, M.A., Cane, P., Clarke, J., Pillay, C., Sirivichayakul, S., Ariyoshi, K., Holguín, A., Rudich, H., Rodrigues, R., Bouzas, M.B., Brun-Vezinet, F., Reid, C., Cahn, P., Brígido, L.F., Grossman, Z., Soriano, V., Sugiura, W., Phanuphak, P., Morris, L., Weber, J., Pillay, D., Tanuri, A., Harrigan, R.P., Camacho, R., Schapiro, J.M., Katzenstein, D., Vandamme, A.M., 2006. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 694–701.
- Steegen, K., Luchters, S., De Cabooter, N., Reynaerts, J., Mandaliya, K., Plum, J., Jaoko, W., Verhofstede, C., Temmerman, M., 2007. Evaluation of two commercially available alternatives for HIV-1 viral load testing in resource-limited settings. *J. Virol. Methods* 146, 178–187.
- Van de Vijver, D.A.M.C., Wensing, A.M.J., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.L., Costagliola, D., Op de Coul, E.L., De Luca, A., Maljkovic, I., De Mendoza, C., Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, A., Hoepelman, I.M., Hemmer, R., Horban, A., Korn, K., Kücherer, C., Leitner, T., Loveday, C., MacRae, E., Meyer, L., Nielsen, C., Ormaesen, V., Perrin, L., Paraskevis, D., Puchhammer-Stockl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J.C.C., Schneider, F., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, G., Stanojevic, M., Vandamme, A.M., van Laethem, K., Violin, M., Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, M., Boucher, C.A.B., 2005. Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to protease inhibitors. *Antivir. Ther.* 10, S145.
- Vasan, A., Renjifo, B., Hertzmark, E., Chaplin, B., Msamanga, G., Essex, M., Fawzi, W., Hunter, D., 2006. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. *Clin. Infect. Dis.* 42, 843–852.
- Wensing, A.M., van de Vijver, D.A., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.L., Costagliola, D., De Luca, A., Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, A., Hemmer, R., Hoepelman, A., Horban, A., Korn, K., Kücherer, C., Leitner, T., Loveday, C., MacRae, E., Maljkovic, I., de Mendoza, C., Meyer, L., Nielsen, C., Op de Coul, E.L., Ormaesen, V., Paraskevis, D., Perrin, L., Puchhammer-Stockl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J.C.C., Schneider, F., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, G., Stanojevic, M., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., Violin, M., Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, M., Boucher, C.A., 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J. Infect. Dis.* 192, 958–966.
- Wilkinson, E., Engelbrecht, S., 2009. Molecular characterization of non-subtype C and recombinant HIV-1 viruses from Cape Town, South Africa. *Infect. Genet. Evol.* 9, 840–846.
- Wirden, M., Tubiana, R., Marguet, F., Leroy, I., Simon, A., Bonmarchand, M., Ait-Arkoub, Z., Murphy, R., Marcelin, A.G., Katlama, C., Calvez, V., 2009. Impact of discrepancies between the Abbott realtime and cobas TaqMan assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 group M non-B subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1543–1545.
- Yebra, G., de Mulder, M., del Romero, J., Rodríguez, C., Holguín, Á., 2010. HIV-1 non-B subtypes: high transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability. *Antiviral Res.* 85, 409–417.
- Yerly, S., von Wyl, V., Ledergerber, B., Boni, J., Schupbach, J., Burgisser, P., Klimkait, T., Rickenbach, M., Kaiser, L., Günthard, H.F., Perrin, L., 2007. Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 21, 2223–2229.
- Zhang, M., Foley, B., Schultz, A.K., Macke, J.P., Bulla, I., Stanke, M., Morgenstern, B., Korber, B., Leitner, T., 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* 7, 25.



HIV-1 non-B subtypes: High transmitted NNRTI-resistance in Spain and impaired genotypic resistance interpretation due to variability

G. Yebra^a, M. de Mulder^a, J. del Romero^b, C. Rodríguez^b, A. Holguín^{a,*}

^a HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Department of Microbiology, Hospital Universitario Ramón y Cajal and CIBER-ESP, Crta. Colmenar Viejo, Km. 9.100, Madrid 28034, Spain

^b Centro Sanitario Sandoval, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2009

Received in revised form 29 October 2009

Accepted 30 November 2009

Keywords:

HIV-1 subtypes

Drug-resistance mutations

Genotypic resistance algorithms

Subtyping tools

ABSTRACT

Genotypic resistance algorithms interpret drug-resistance mutations, but are mainly developed for HIV-1 subtype B, meanwhile non-B subtypes cause 90% of worldwide infections. They include clade-specific amino acid at drug-resistance positions different than subtype B.

This study explores: (i) the variability at resistance-related positions in 128 non-B and 226 B sequences from 354 treatment-naïve patients diagnosed in Spain (1999–2007); (ii) the discordances between five resistance interpretation algorithms (ANRS, Stanford, Rega, Geno2pheno, RIS); and (iii) the reliability of five subtyping tools (Stanford, Geno2pheno, Rega, NCBI, EuResist) for each HIV-1 variant.

Primary drug-resistance prevalence was 13.6%, although higher in non-B vs. B subtypes (18.7% vs. 10.6%), due to a twofold higher NNRTI-resistance prevalence (15.7% vs. 7.6%). Most secondary PI-resistances, more frequent in non-B, were in fact clade-specific residues. Most sequences were interpreted as susceptible to all antiretrovirals by the five resistance algorithms, except for tipranavir by ANRS in non-B clades. Interalgorithm discordances were significantly higher in non-B variants for specific drugs. The agreement with phylogenetic analysis differed among subtyping tools testing non-B variants.

We found a higher prevalence of NNRTI-resistance mutations in non-B subtypes. Certain algorithms overestimate the resistance in non-B subtypes due to natural patterns of mutations. Subtyping tools should be optimised for non-B variants.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The expanding use of antiretroviral drugs for the treatment against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) favours the emergence of virus harbouring resistance mutations. This can generate an increasing prevalence of primary resistance mutations in viruses from treatment-naïve patients who have been infected by pre-treated subjects, compromising the effectiveness of the first antiretroviral therapy. Transmission of drug resistant viruses has been widely reported in Europe and the USA, with a prevalence ranging from 5% to 15% (Booth and Geretti, 2007; Sagir et al., 2007; Wensing et al., 2005; Wheeler et al., 2007). In Spain, the rate of primary resistance mutations differs among regions and time periods, but these mutations are present in around 10% of treatment-naïve patients (de Mendoza et al., 2005; Martínez-Picado et al., 2005; Palacios et al., 2008; Sanchez-Oñoro et al., 2007). The rate rarely reaches 10% in treatment-naïve patients from developing countries (Geretti, 2007; Nyombi et al., 2008; Ojesina et al., 2006), and is

mainly limited to a few reverse transcriptase inhibitors (RTI), which are the most available drugs in these countries.

International guidelines recommend routine HIV resistance testing for the selection of an optimal antiretroviral therapy selection. Genotypic resistance tests are used more than phenotypic tests, due to their lower costs and easier implementation. Several online algorithms have been developed by correlating genotypic patterns with clinical or phenotypic data. Recent reports have demonstrated their utility to predict virological response in the clinical settings (Rhee et al., 2009). Furthermore, they are inexpensive and widely used for detection and interpretation of resistance mutations using *pol* (protease, PR and reverse transcriptase, RT) sequences.

Both genotypic drug-resistance interpretation algorithms and resistance prevalence studies have been mainly based on results derived from patients infected by subtype B. This is the most prevalent HIV-1 variant in industrialized countries where all antiretroviral drugs are available. However, the remaining HIV-1 variants (non-B subtypes and recombinants), traditionally ignored in the studies, are responsible for 90% of the 33 million infections worldwide (Hemelaar et al., 2006; UNAIDS, 2009). They are prevalent in developing regions and are continuously increasing among new infections in Western countries, including Spain (Holguín et

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3368152; fax: +34 91 3368809.

E-mail addresses: aholguin.hcii@salud.madrid.org, aholguinhcii@gmail.com (A. Holguín).

al., 2008a). HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants have a high genetic variability when the consensus of subtype B is used as reference for the definition of resistance mutations. HIV-1 variants show clade-specific polymorphisms (substitutions present in more than 10% of samples from treatment-naïve patients). Non-B subtypes can also present different wild-type amino acids than subtype B in positions related to drug-resistance to RTI and protease inhibitors (PIs) (Kantor and Katzenstein, 2003). This can be misinterpreted by algorithms. Moreover, scored drug-resistance mutations still vary among different algorithms (Champenois et al., 2008), which complicates the comparison of genotypic resistance among them, mostly when HIV-1 non-B variants are studied and secondary or minor resistance mutations are analyzed. The influence of this clade-specific pattern in the antiretroviral long-term response for each drug in each HIV-1 subtype and recombinant is still unknown. Thus, it is important to clarify the nature and frequency of clade-specific residues in viral positions related to drug-resistance in treatment-naïve patients infected by different HIV-1 subtypes and recombinants. Also it is important to study their influence in interalgorithm discordances.

Hence it is essential to identify HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRF). Phylogenetic analysis (phy) is the gold standard method for subtyping, although it is not widely implemented in clinical settings because of its complexity. Most clinicians use online subtyping tools, despite their limitations for the correct classification of some non-B subtypes and most recombinants different to CRF02_AG (Holguín et al., 2008b). This study reports: (i) the prevalence of primary and secondary drug-resistance mutations in 128 HIV-1 non-B and recombinant variants vs. 226 clade B sequences from 354 treatment-naïve patients diagnosed in Spain from 1999 through 2007; (ii) the reliability of interpretation of drug-resistance by five algorithms free of charge and available online used in clinical practice in all analyzed sequences belonging to different HIV-1 subtypes and recombinants; and (iii) the reliability of five rapid subtyping tools in detecting HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRF) compared to phylogenetic analysis.

2. Patients and methods

2.1. Study population

Pol sequences from plasma samples from 354 HIV-1-infected patients unexposed to antiretroviral therapy, according to the clinical reports, were collected. Patients were diagnosed from 1999 through 2007 in four Spanish HIV/AIDS clinics: 210 in Centro Sanitario Sandoval (Madrid), 130 in Hospital Carlos III (Madrid), 5 in Hospital de Móstoles (Madrid), 5 in Hospital Doctor Negrín (Las Palmas, Canary Islands) and 4 in NGO Medicus Mundi facilities (Madrid). The patients were native Spaniards (45.8%), South-Americans (20.6%), Africans (18.6%), other Europeans (5.9%), Asians (0.3%), and of unknown origin (8.8%). Epidemiological data suggested that most of the migrants had probably been infected overseas.

PR and RT sequences were available from 210 of 226 subtype B sequences and 108 of 128 non-B subtypes. In the remaining cases only PR was available. Of the 354 sequences, 64 non-B and 67 subtype B *pol* sequences were previously published (Gutiérrez et al., 2004; Holguín et al., 2007, 2008a). The new HIV-1 sequences were from patients under follow up in Centro Sanitario Sandoval ($n = 191$), Hospital Carlos III ($n = 29$), Hospital de Móstoles ($n = 3$), and NGO Medicus Mundi ($n = 4$), all located in Madrid, Spain.

This study was part of a project approved by a review board and Ethical Committee of our institution. It was designed to protect the rights of all subjects involved under the appropriate local regula-

tions. To maintain subject confidentiality, a unique ID number was assigned to each specimen.

2.2. HIV-1 subtyping

Direct sequencing of nested PCR purified products from viral RNA was performed in the HIV-1 *pol* coding region. *Pol* sequences included the complete protease (codons 1–99) and part of the reverse transcriptase (codons 1–247 or 1–335) using Tru-gene (Siemens, Barcelona, Spain) or Viroseq (Celera Diagnostics, Alameda, CA, USA) assays, respectively. In some specimens with amplification difficulties, PR and/or RT amplification was made using primers and conditions reported elsewhere, utilizing an automatic sequencer for sequencing (ABI Prism, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Holguín et al., 2005, 2006a).

All 354 *pol* sequences were subtyped by phylogenetic analysis. At least two representative sequences of each subtype/CRF within HIV-1 group M available at the moment of the analysis were taken as references. DNA sequences were aligned using the ClustalW program. The tree topology was obtained using the Neighbour-Joining method. The pairwise distance matrix was estimated using the Kimura two-parameter model within the DNADIST program, as implemented in the PHYLIP software package. Bootstrap re-sampling (1000 data sets) of the multiple alignments was performed to test the statistical robustness of the tree. Bootstrap cut-off was set at 700.

Besides using phylogenetic analysis, HIV-1 subtyping was also assessed in all *pol* sequences by five online rapid subtyping tools: Stanford 4.3.7, Geno2pheno 3.0, Rega 2.0, NCBI 2008 and EuResist 2008. They were available at: <http://hivdb.stanford.edu> (HIV-1 Drug Resistance Database; Stanford University, Palo Alto, CA); <http://www.geno2pheno.org> (Max Planck Institute for Informatics, Saarbrücken, Germany); <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html> (Rega University, Leuven, Belgium); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi> (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) and http://engine.euresist.org/data_analysis/viral_sequence/new (EuResist Project, Roma, Italy). A discrepancy was considered when the subtyping tool assigned a different HIV-1 subtype or CRF than that provided by phy.

2.3. Genotypic drug-resistance interpretation algorithms

Drug-resistance mutations defined by the International AIDS Society-USA (IAS) (Johnson et al., 2008) were manually located in the *pol* sequences. Resistance mutations at PR gene were classified as primary (major) or secondary (minor) following the IAS-USA nomenclature. We considered primary or major mutations at PR: D30N, V32I, L33F, M46I/L, I47V/A, G48V, I50L/V, I54M/L, Q58E, T74P, L76V, V82A/T/F/S/L, I84V, N88S, L90M; as secondary mutations at PR: L10V/I/R/F/C, V11I, I13V, G16E, K20R/M/I/T/V, L24I, L33I/V/F, E34Q, E35G, M36I/L/V, K43T, F53L/Y, I54V/T/A/S, D60E, I62V, L63P, I64L/M/V, H69K, A71V/I/T/L, G73C/S/T/A, V77I, V82I, N83D, I85V, N88D, L89V, I93L/M. Resistance mutations at RT: M41L, A62V, K65R, D67N, T69 insertion, K70R/E, L74V, V75I, F77L, V90I, A98G, L100I, K101E/H/P, K103N, V106M/A/I, V108I, Y115F, F116V, E138A, Q151M, V179D/F/T, Y181C/I/V, M184V/I, Y188C/L/H, G190S/A, L210W, T215Y/F, T215rev, K219Q/E, P225H and M230L. The objective was to study their prevalence among each HIV-1 subtype and CRF from naïve subjects, as well as their influence in the prediction of resistance to each PR or RT inhibitor in current therapeutic use.

The concordance between five different genotypic resistance algorithms (ANRS 2008.07, Stanford 4.3.7, Rega 7.1.1, Geno2pheno 3.0, and RIS-2008) was also studied. For that purpose, all 354 *pol* sequences were introduced in the corresponding web-

Table 1
Substitutions in PR (a) and RT (b) associated with drug-resistance in sequences from 354 treatment-naïve patients carrying different HIV-1 variants.

(a) Substitutions at PR	HIV-1 variants (no.)																	% of HIV-1 variants		p
	Subtypes								CRF									Non-B (128)	B (226)	
	A (9)	B (226)	C (8)	D (1)	F (8)	G (15)	02 (41)	06 (5)	10 (3)	11 (2)	12 (16)	13 (1)	14 (9)	19 (1)	22 (1)	23 (6)	31 (2)			
Primary																				
V32I	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	0	NS
L33F	–	1	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	0.4	NS
M46I/L	1	3	–	–	–	–	1	–	1	–	–	–	1	–	–	–	–	3.1	1.3	NS
Q58E	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	2.3	0	NS
I50L/V	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.4	NS
V82A/T/F/S/L	–	3	–	–	–	–	–	–	1	–	3	–	–	–	–	–	–	3.1	1.3	NS
L90M	–	4	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	1.8	NS
Secondary																				
L10V/I/R/F/C	3	25	–	–	3	2	8	–	–	1	5	–	1	–	–	–	1	18.7	11.1	<0.05
V11I	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	0	NS
I13V	7	42	2	–	1	13	33	5	2	1	3	1	9	–	1	6	1	66.4	18.6	<0.05
G16E	2	1	–	–	2	1	6	1	–	1	3	–	–	–	–	–	2	14.1	0.4	<0.05
K20R/M/I/T/V	3	8	1	–	3	15	38	5	–	–	5	1	9	–	–	6	2	68.7	3.5	<0.05
L24I	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.4	NS
L33I/V	1	11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	4.9	<0.05
E34Q	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	0	NS
E35G	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.8	0	NS
M36I/L/V	8	38	7	1	6	15	38	5	3	1	16	1	9	1	1	6	1	93	16.8	<0.05
K43T	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.4	NS
F53L/Y	–	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1.8	NS
I54V/T/A/S	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	3	–	–	–	–	–	–	2.3	1.3	NS
D60E	–	5	–	–	–	–	–	–	1	2	–	–	–	–	–	–	–	2.3	2.2	NS
I62V	–	49	–	–	1	1	1	1	1	–	1	–	1	–	–	–	–	5.5	21.7	<0.05
L63P	–	119	3	1	2	4	4	–	1	–	–	–	–	–	1	–	1	13.3	52.6	<0.05
I64L/M/V	2	59	–	–	–	1	5	3	1	–	1	–	–	–	–	3	–	12.5	26.1	<0.05
H69K	9	1	8	–	–	15	40	4	2	2	2	1	9	–	1	6	2	78.9	0.4	<0.05
A71V/I/T/L	–	36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	15.9	<0.05
V77I	–	74	1	–	1	2	1	–	–	1	–	1	–	–	–	–	–	5.5	32.7	<0.05
V82I	–	1	–	–	–	12	1	–	–	–	–	–	9	–	–	6	–	21.9	0.4	<0.05
I93L/M	1	80	6	–	–	1	1	–	–	–	4	–	–	–	–	1	1	11.7	35.4	<0.05
(b) Substitutions at RT	HIV-1 variants (n)																	% of HIV-1 variants		p
	Subtypes								CRF									Non-B (108)	B (210)	
	A (8)	B (210)	C (8)	D (1)	F (7)	G (6)	02 (38)	06 (3)	10 (3)	11 (2)	12 (16)	14 (8)	23 (6)	31 (2)						
NRTI-resistance																				
M41L	–	4	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	0.9	1.9	NS
A62V	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	1.4	NS
K65R	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.5	NS
D67N	–	3	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	0.9	1.4	NS
K70R/E	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.9	NS
L74V	–	1	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.9	0.5	NS
F77L	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.9	–	NS
M184V/I	–	1	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1.8	0.5	NS
L210W	–	3	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	0.9	1.4	NS
T215Y/F	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0	0.5	NS
T215rev	1	2	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	1.8	2.9	NS
K219Q/E	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	0.9	0.9	NS

Table 1 (Continued)

(b) Substitutions at RT	HIV-1 variants (n)		CRF												% of HIV-1 variants		p
	Subtypes																
	A (8)	B (210)	C (8)	D (1)	F (7)	G (6)	O2 (38)	O6 (3)	10 (3)	11 (2)	12 (16)	14 (8)	23 (6)	31 (2)	Non-B (108)	B (210)	
NNRTI-resistance																	
V90I	-	1	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	5.6	0.5
K101E/P	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	0.5
K103N	1	9	-	-	-	-	1	-	1	-	2	-	-	-	-	5.6	4.3
V106M/A/I	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	3.7	-
V179D/F/T	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1.9
Y181C/I/V	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	0.5
G190S/A	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-
P225H	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-

No., number; PR, protease; RT, reverse transcriptase; NNRTI, nucleoside RT inhibitors; NRTI, non-nucleoside RT inhibitors; CRF, circulating recombinant form (the numbers indicate the specific CRF: CRF02_AG, CRF06_cpx, CRF10_CD, CRF11_cpx, CRF12_BF, CRF13_cpx, CRF14_BG, CRF19_cpx, CRF22_01A1, CRF23_BG, and CRF31_BC); NS, not significant (p -value >0.05); dash means no changes. In bold, those amino acids that are, in fact, the wild-type amino acid in the corresponding HIV-1 subtype/CRF according to Los Alamos HIV Database (www.hiv.lanl.gov). Drug-resistance mutations are listed according to IAS-USA (Johnson et al., 2008). At the PR no primary mutations D30N, I47V/A, G48V, I54M/L, T74P, L76V, I84V and N88S were found. At the RT, neither T69insertion nor changes V75I, A98G, L100I, V108I, Y115F, F116V, E138A, Q151M, Y188C/I/H and M230L were observed. T215rev in RT means T215 revertants including changes T215A/C/D/E/G/H/I/L/N/S/V. Some of the sequences presented more than one change.

sites: ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>), Stanford HIVDB (http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showSequenceForm), Rega (<http://www.rega.kuleuven.be/cev>), Geno2pheno (<http://www.geno2pheno.org>) and RIS (Spanish AIDS Research Network, http://www.retic-ris.net/default_principal.asp?idx=&idioma=2). All algorithms provided different resistance levels. Thus, they were normalized for a better comparison in three resistance levels: susceptible (S), intermediate (I), and resistant (R), as in the HIValg Program in the Stanford website (<http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/HIValg.html>).

Interpretations were considered concordant when all algorithms assigned the same level of resistance (S, I or R) to a specific sequence for a particular drug. We considered full discordances when one of the algorithms scored a sequence as S for a particular drug and another one as R. Partial discordances were considered when: (1) one algorithm scored a specific sequence as S for a particular drug and another one as I, or (2) when one algorithm scored a sequence as I for a particular drug and another one as R.

2.4. Statistical analysis

Chi-square test was performed with Epi Info 3.5 program (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Phylogenetic characterization of HIV-1 variants

Among the 354 HIV-1 *pol* sequences, 226 (63.8%) were ascribed to clade B by phylogenetic analysis and 128 (36.2%) to non-B subtypes and recombinants: 9 A, 8 C, 1 D, 8 F, 15 G, 41 CRF02_AG, 5 CRF06_cpx, 3 CRF10_CD, 2 CRF11_cpx, 16 CRF12_BF, 1 CRF13_cpx, 9 CRF14_BG, 1 CRF19_cpx, 1 CRF22_01A1, 6 CRF23_BG and 2 CRF31_BC. Patients infected by non-B variants came from Spain (16.4%), sub-Saharan Africa (50%), South-America (16.4%), other European countries (6.2%), or were of unknown origin (11%). Subjects carrying subtype B came from Western Europe (68.1%), South-America (23%), North-Africa (0.9%), Asia (0.4%), or were of unknown origin (7.6%). New sequences were submitted to GenBank: from FJ481650 to FJ481713 (64 non-B variants) and from FJ481714 to FJ481872 (159 subtype B).

3.2. Twofold higher prevalence of global primary and NNRTI-resistance mutations in non-B vs. B subtypes

Global primary drug-resistance prevalence (i.e., to any antiretroviral drug class) in viruses from 354 treatment-naïve patients from Spain collected during 1999–2007 was 13.6% (Fig. 1). All carried primary or major resistance mutations in PR or/and RT. Considering the HIV-1 variant, prevalence was almost twofold higher in non-B subtypes than in clade B viruses (18.7% vs. 10.6%, $p < 0.05$) due to a twofold higher prevalence of NNRTI-resistances (13.1% vs. 7.1%, $p < 0.05$). Prevalence of drug-resistance mutations was similar in non-B vs. B subtype for PI (6.2% vs. 4.4%) and NRTI (4.6% vs. 5.2%) (Fig. 1). We observed a similar rate of non-B vs. B viruses showing resistance to 2 and 3 drug classes, ranging from 2 to 4%.

The nature and frequency of primary and secondary (or minor) drug-resistances found in each HIV-1 variant is recorded in Table 1. Most frequent primary PI-resistance mutations were M46L (3.1%) and V82A (3.1%) in non-B and M46L/I (3.1%) and L90M (1.8%) in subtype B. For NRTI-resistance substitutions, M184V (1.8%) and M41L (1.9%) were the most common changes in non-B and B, respectively. Surprisingly, the frequency of T215 revertants, normally the most

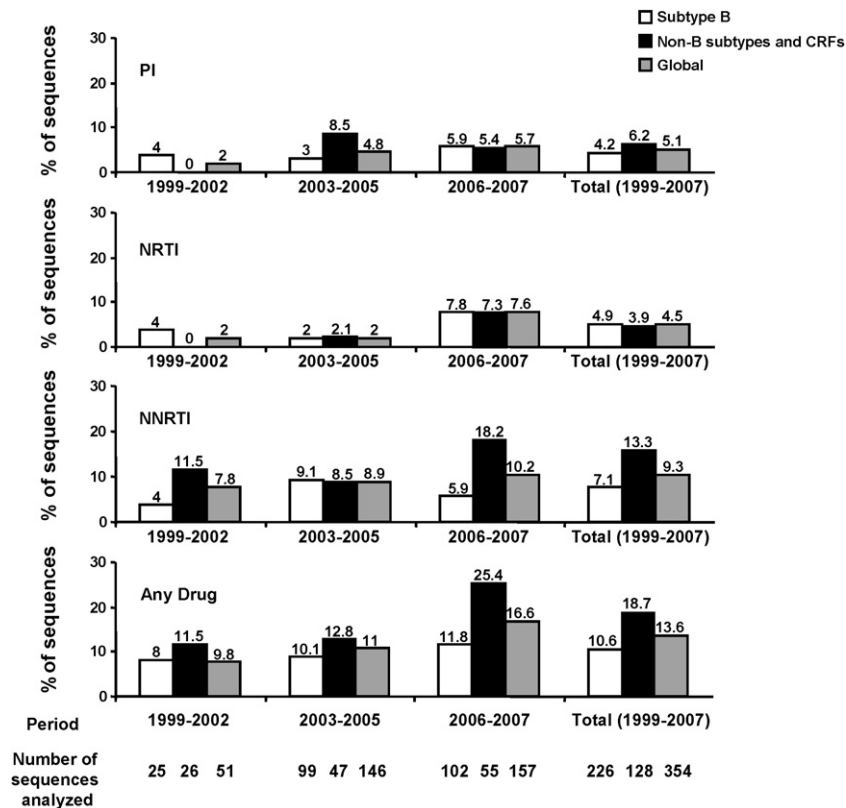


Fig. 1. Prevalence of sequences with primary drug-resistance mutations across HIV-1 subtypes from 354 treatment-naïve patients in Spain across years (1999–2007). PI, protease inhibitors; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; CRFs, circulating recombinant forms. Figures on the top of the bars indicate the percentage of sequences with primary resistance mutations.

commonly transmitted drug-resistance, was very low. Finally, the most frequent NNRTI-resistance mutations were V90I and K103N (5.6% each one) in non-B and K103N (4.3%) in clade B variants (Table 1).

3.3. Most secondary PI-resistance mutations are clade-specific amino acids

Most (100% non-B, 93% B) of 354 PR sequences presented secondary or minor PI-resistance mutations, different in frequency and nature across variants since some of them were the wild-type amino acid in some subtypes and recombinants (Table 1). This could explain the higher frequency of amino acid related to secondary resistance in residues 10, 13, 16, 20, 36, 69, and 82 in

specific non-B clades and in residues 62, 63, 64, 71, 77, and 93 at clade B variants (Table 1). For instance, substitutions M36I (related to atazanavir, indinavir, nelfinavir and tipranavir-resistance) and H69K (related to tipranavir-resistance) were detected in most analyzed non-B specimens. Additionally, change V82I (related to atazanavir-resistance) appeared in all CRF14_BG, CRF23_BG, and 80% of subtype G specimens in our country.

3.4. High interalgorithm discrepancies in non-B subtypes for specific drugs

Drug susceptibility to 19 drugs (PI, NRTI and NNRTI) was predicted in all 354 non-B and B sequences using five different algorithms: French ANRS 2008.07, Stanford 4.3.7, Rega 7.1.1, Geno2pheno 3.0 and RIS 2008.

Table 2

Percentage of HIV-1 sequences from 354 treatment-naïve subjects with genotypic drug-resistance interpretation to 19 different drugs provided by five online genotypic resistance algorithms.

Drugs	HIV-1 variants (no.)	Genotypic resistance algorithms (% of sequences scored to each level of resistance)														
		ANRS 2008.07			Stanford 4.3.7			Rega 7.1.1			Geno2pheno 3.0			RIS 2008		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
PI	Non-B (128)	9.4	14.8	75.8	94.4	5.5	0.8	94.4	3.1	3.1	94.4	3.1	3.1	94.4	3.1	3.1
	B (226)	92.5	2.6	4.9	94.7	4.9	0.4	95.6	2.6	1.8	95.6	2.2	2.2	96	3.1	0.9
NRTI	Non-B (108)	95.4	1.8	2.8	92.6	4.6	2.8	94.4	2.8	2.8	78.7	14.8	6.5	95.4	1.8	2.8
	B (210)	93.8	2.4	3.8	93.3	5.2	1.4	93.3	3.8	2.9	81	16.7	2.4	93.8	3.8	2.4
NNRTI	Non-B (108)	81.5	0	18.5	91.7	0.9	7.4	91.7	0.9	7.4	91.7	0	8.3	92.6	0	7.4
	B (210)	95.7	0	4.3	94.3	1.4	4.3	95.7	0	4.3	94.8	0	5.2	95.2	0	4.8

No., number of sequences; PI, protease inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; S, percentage of sequences interpreted as susceptible by the respective algorithm for a drug family; I, intermediate resistant; R, resistant. ANRS 2008.07 (<http://www.hivfrenchresistance.org>), Stanford HIVDB 4.3.7 (http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showSequenceForm), Rega 7.1.1 (<http://www.rega.kuleuven.be>), Geno2pheno 3.0 (<http://www.geno2pheno.org>) and RIS 2008 (http://www.retic-ris.net/default_principal.asp?idx=&scidioma=2).

Table 3Discordances between five genotypic drug-resistance interpretation algorithms testing 128 non-B and recombinants vs. 226 subtype B *pol* sequences.

Drugs	Full discordances			Partial discordances			Concordances non-B/B
	Non-B/B (%)	<i>p</i>	Variants with discordances	Non-B/B (%)	<i>p</i>	Variants with discordances	
Any PI	76.6/4.4	<0.01	99 non-B, 17B	10.9/6.6	NS		22.3/92.5
Atazanavir	2.3/1.3	NS		2.3/2.6	NS		95.3/96.0
Darunavir	0/0	–		0.8/0.9	NS		99.2/99.1
Fosamprenavir	3.1/0.4	0.04	3CRF12.BF, 1CRF10.CD, 1B	0/2.2	NS		96.9/97.3
Indinavir	2.3/1.8	NS		3.1/1.3	NS		94.5/96.0
Lopinavir	2.3/1.3	NS		0.8/0.9	NS		96.9/97.8
Saquinavir	0/0	–		4.7/3.1	NS		95.3/96.9
Nelfinavir	0/0.4	NS		6.2/3.5	NS		94.5/96.0
Tipranavir	73.4/0.9	<0.01	94 non-B, 2B	10.9/1.8	<0.01	14 non-B, 4B	12.5/97.3
Any NRTI	5.6/3.8	NS		16.7/13.8	NS		83.3/85.2
Lamivudine	0.9/0	NS		0.9/1.9	NS		98.1/98.1
Abacavir	0.9/0.4	NS		2.8/2.9	NS		95.4/96.7
Zidovudine	0.9/0.9	NS		1.8/4.3	NS		97.2/94.8
Estavudine	0/0.9	NS		9.3/12.6	NS		90.7/86.2
Didanosine	6.5/1.9	0.03	4CRF02.AG, 1A, 1CRF10.CD, 1CRF14.BG, 4B	6.5/3.8	NS		87.0/94.3
Emtricitabine	0/0	–		0.9/1.4	NS		99.1/98.6
Tenofovir	0.9/1.4	NS		1.8/7.6	0.03	16B, 1A, 1CRF10.CD	97.2/90.9
Any NNRTI	11.1/1.9	<0.01	8CRF14.BG, 2CRF23.BG, 1C, 1CRF10.CD, 4B	0.9/0.9	NS		87.0/97.1
Delavirdine	0/0	–		0/0.5	NS		100/99.5
Efavirenz	0.9/0	NS		0/0	–		99.1/100
Etravirine	0/0.5	NS		0.9/0.5	NS		99.1/99.0
Nevirapine	11/1.4	<0.01	8CRF14.BG, 2C, 2CRF23.BG, 3B	0/0.5	NS		88.9/98.1
Any RTI	15.7/5.7	<0.01	8CRF14.BG, 4CRF02.AG, 2C, 2CRF23.BG, 1A, 12B	17.6/14.8	NS		73.2/83.3

Drug susceptibilities to protease inhibitors (PIs), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) were predicted using five different algorithms: ANRS 2008.07, Stanford 4.3.7, Rega 7.1.1, Geno2pheno 3.0, and RIS 2008. In bold, specific drugs showing significant ($p < 0.05$) differences in full or partial discordances comparing non-B vs. B sequences (128/108 non-B and 226/210 subtype B PR/RT sequences from different antiretroviral-naïve patients). The 354 analyzed sequences were: 9A, 226B, 8C, 1D, 8F, 15G, 41CRF02.AG, 5CRF06.cpx, 3CRF10.CD, 2CRF11.cpx, 16CRF12.BF, 1CRF13.cpx, 9CRF14.BG, 1CRF19.cpx, 1CRF22.01A1, 6CRF23.BG and 2CRF31.BC. Full discordances when one of the algorithms scored a sequence as S for a particular drug and another one as R. Partial discordance when one of the algorithms scored the sequences as S for a particular drug and another one scored it as I, or when one of the algorithms scored the sequences as I for a particular drug and another one scored it as R. The five algorithms analyzed the susceptibility to all the drugs shown except for darunavir, tipranavir and etravirine (not provided by Geno2pheno), nelfinavir (not provided by RIS) and delavirdine (not provided by ANRS and RIS algorithms). NS, Chi-square test showed non-significant differences ($p > 0.05$). Zalcitabine resistance was not included because it could only be tested by the Geno2pheno algorithm.

Geno2pheno 3.0, and Spanish RIS 2008. Their interpretations are shown in Table 2. Most sequences were interpreted as susceptible (S) to all antiretrovirals by the five algorithms, except for tipranavir by ANRS in non-B. On the other hand about 4–8% of the 354 sequences from treatment-naïve patients were intermediate (I) or resistant (R) to specific drugs by all algorithms. ANRS ascribed as I or R to a significantly higher number of non-B vs. B sequences for PI (90.6% vs. 7.5%, $p < 0.05$) and NNRTI (18.5% vs. 4.3%, $p < 0.05$). The other algorithms ascribed as I or R to PI or NNRTI were 6–7% or 8% of non-B sequences, respectively. Stanford was the algorithm that provided the lowest number of HIV-1 sequences as R to PI (Table 2). Geno2pheno ascribed as not susceptible (I or R) to NRTI a higher number of non-B and B sequences than other algorithms (around 20% vs. 5–7%).

Considering HIV-1 variants, interalgorithm discordances (including both full and partial) were significantly higher in non-B vs. B variants for NNRTIs (13% vs. 2.9%, $p < 0.05$), and similar for NRTI (16.7% vs. 14.8%, $p = \text{NS}$) and for PIs excluding tipranavir (8.6% vs. 5.7%, $p = \text{NS}$) (Table 3). Regarding drug families, interalgorithm discordances (full and partial) were significantly more frequent for NRTI vs. NNRTI or PI excluding tipranavir in all variants (15.4% vs. 6% or 6.8%, respectively; $p < 0.01$) but were similar among drug families when only full discordances were considered (4.4%, 5%, and 4.2%, respectively). Considering specific drugs, non-B variants displayed significantly more interalgorithm full discordances than subtype B for tipranavir (73.4% vs. 0.9%, $p < 0.05$), fosamprenavir (3.1% vs. 0.4%, $p < 0.05$), nevirapine (11% vs. 1.4%, $p < 0.05$) and didanosine (6.5% vs. 1.9%, $p < 0.05$), and lower partial

discrepancies than clade B for tenofovir (1.8% vs. 8.6%, $p < 0.05$) (Table 3).

Sequences with changes in residues M36, H69 and L89, highly common in non-B viruses (Table 1), were considered as R to tipranavir by ANRS and as I when two of these changes appeared. For ANRS, all non-B sequences were susceptible to didanosine, since this algorithm, in contrast to the remaining tools, did not include L74V as a didanosine-resistance mutation. Geno2pheno considered sequences with I135T, in combination with V60I or T200A, as I to tenofovir, although none of them were included in the IAS-USA list. ANRS interpreted a higher number of nevirapine-resistant non-B sequences, due to the inclusion of the A98S change. This is actually the wild-type residue in CRF14.BG (www.hiv.lanl.gov), first described in Spain (Delgado et al., 2002), and it is also a natural polymorphism in CRF24.BG.

3.5. Low reliability of five online rapid subtyping tools in the assignment of non-B subtypes and recombinants

The 354 *pol* HIV-1 sequences were introduced in five online rapid subtyping tools (Stanford, Geno2pheno, Rega, NCBI and EuResist) to test their agreement with phy (Table 4). Most subtype B sequences, prevalent in developed countries, were correctly assigned (87.2–99.6%), the worst was NCBI and the best was Stanford. The five tools showed a low agreement with phy ascribing non-B variants and differed among tools. Only three quarters of the sequences were correctly assigned by Geno2pheno (75.8%) and EuResist (71.9%), and results were even lower for NCBI (60.9%), Rega

Table 4

Agreement of five online subtyping tools vs. phylogenetic analysis in 354 sequences from different HIV-1 variants.

HIV-1 variant ^a (no.)	HIV-1 subtyping method					
	Phy vs. Stanford ^b	Phy vs. Geno2pheno	Phy vs. Rega ^c	Phy vs. Rega ^d	Phy vs. NCBI	Phy vs. EuResist
A (9)	22.2	44.4	88.9	100	11.1	33.3
C (8)	87.5	100	87.5	100	87.5	100
D (1)	100	100	100	100	0	0
F (8)	87.5	87.5	100	100	25	100
G (15)	93.3	93.3	73.3	100	53.3	86.7
CRF02_AG (41)	82.9	95.1	63.4	84.4	92.7	92.7
CRF06_cpx (5)	0	100	60	100	60	100
CRF10_CD (3)	0	33.3	0	0	0	0
CRF11_cpx (2)	0	50	100	100	100	50
CRF12_BF (16)	0	43.7	43.7	70	43.7	37.5
CRF13_cpx (1)	0	100	0	–	100	100
CRF14_BG (9)	0	100	0	0	100	100
CRF19_cpx (1)	0	0	0	–	0	0
CRF22_01A1 (1)	0	0	0	–	0	0
CRF23_BG (6)	0	0	0	–	0	0
CRF31_BC (2)	0	0	0	0	0	0
Pure non-B subtypes (41)	75.6	82.9	85.4	100	43.9	78
Recombinants non-CRF02_AG (46)	0	52.2	26.1	50	47.8	47.8
Total Recombinants (87)	39.1	72.4	43.7	69.6	69	69
Total Non-B (128)	50.8	75.8	57	81.3	60.9	71.9
Subtype B (226)	99.6	95.1	90.7	100	87.2	97.8

No., number of sequences; Phy, phylogenetic analysis considered as the gold standard subtyping method; CRF, circulating recombinant forms; dash indicates those cases when Rega did not assign any of the sequences of the subtype/CRF. Websites: Stanford HIVDB 4.3.7, (http://hivdb6.stanford.edu/asi/deployed/hiv_central.pl?program=hivdb&action=showSequenceForm), Geno2pheno 3.0 (<http://www.geno2pheno.org>), Rega 2.0 (<http://www.bioafrica.net/subtypetool/html>), NCBI 2008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) and EuResist 2008 (<http://engine.euresist.org>).

^aSubtypes in the *pol* coding region.

^bStanford differentiated protease and reverse transcriptase in the analysis. Out of 63 failures, 6 occurred in a PR with RT correctly subtyped and 4 vice versa.

^cRega analysis including or ^dexcluding all the sequences not assigned to a subtype by the Rega tool (6 “pure” non-B subtypes, 31 CRF and 21 clade B).

(57%) and Stanford (50.8%) (Table 4). Rega was unable to assign any subtype in 21 (9.3%) B sequences and 37 (29%) non-B variants, and 84% of them were CRF. Rega's agreement increased up to 81.3% when only assigned subtypes were considered.

Results were better for pure non-B subtypes than for CRF, except for NCBI (Table 4). The agreement with phy testing pure non-B subtypes was higher for Geno2pheno (82.9%) and Rega (85.4%), and lower for EuResist (78%), Stanford (75.6%) and NCBI (43.9%). CRF02_AG was the best assigned, reaching 90% in some tools. However, only 50% of the 46 specimens ascribed as CRF by phy other than CRF02_AG, were correctly assigned by all online tools except Stanford, which did not identify any of them. None of the online tools could correctly subtype any CRF19_cpx, CRF22_01A1, CRF23_BG or CRF31_BC (Table 4). In summary, none of the five subtyping tools showed a complete reliability in the assignment of non-B subtypes and recombinants, although Geno2pheno, EuResist and Rega showed the best global results. Rega showed the best results subtyping pure non-B subtypes and NCBI the worst. Geno2pheno had the highest agreement in recombinant assignment and Stanford the lowest.

4. Discussion

This study analyzed different aspects. Firstly, it defined the drug-resistance prevalence in a large cohort of treatment-naïve patients infected by different HIV-1 subtypes and CRF in Spain. Secondly, it reported the discordances in resistance interpretation comparing five online algorithms. Thirdly, it showed the agreement of five online tools with phylogenetic analysis (phy) for HIV-1 subtyping. The overall prevalence of drug-resistance mutations found (13.8%) was similar to other surveillance studies in Europe and Spain (Booth and Geretti, 2007; de Mendoza et al., 2005; Sanchez-Oñoro et al., 2007; Wensing et al., 2005; Wheeler et al., 2007), although it was higher in some areas (Shet et al., 2006). To our knowledge, the study cohort of treatment-naïve subjects infected by HIV-1 non-B subtypes and recombinants is one of the largest identified in

Madrid and in Spain including these variants. However, the number of samples analyzed for certain subtypes and/or recombinants was very limited. It would be more appropriate to have a significant number of each HIV-1 variant instead of merging all in a single group, given that each clade has its own peculiar characteristics and specific wild-type sequence. Nevertheless, this is not always possible due to the unequal distribution of non-B subtypes in our country. In addition, the number of patients does not allow the reliable analysis of the trends of resistance over time. These trends of transmitted resistance vary depending on the time period, geography and cohort characteristics, including the country of origin. An additional source of variation is that distinct drug-resistance surveillance studies are based on different lists of drug-resistance mutations.

Nevertheless, the knowledge of primary resistance can be cost-effective during the clinical practice and treatment proposed regimen (Smith et al., 2007). Our treatment-naïve population presented a significantly higher prevalence of drug-resistance mutations in non-B vs. B subtypes. This was due to the higher rate of NNRTI-resistance mutations in certain variants, mainly in CRF02_AG (19.5% of sequences with NNRTI-resistance mutations vs. 7.1% in subtype B, $p < 0.05$) (Table 1b). In fact, CRF02_AG variants are the most frequent HIV-1 non-B viruses in Spain (Holguín et al., 2008b). NNRTIs are frequently used in the native countries of most foreign non-B infected patients in Spain. It was also recently reported that transmission of NNRTI-resistances in Europe is rising faster than for other antiretroviral families (SPREAD programme, 2008). It would be useful if non-B variants were detected among these NNRTI-resistant viruses in future European surveillance studies.

New HIV-1 diagnoses caused by non-B variants increased in Spain in the last decade (Holguín et al., 2008a), as in other industrialized countries (Aggarwal et al., 2006; Pillonel et al., 2008). Thus, HIV-1 subtype and country of infection of treatment-naïve patients should be considered in drug-resistance studies, since resistance prevalence may differ in subjects infected in areas with fewer avail-

able drugs. Accordingly, there is a low resistance prevalence in non-B infected patients living in developing countries with scarce therapy distribution (Agwale et al., 2006; Booth and Geretti, 2007; Vessière et al., 2006).

We observed a high frequency of secondary PI-resistance mutations in all variants, which showed a different nature among HIV-1 subtypes and CRF. Despite the low number of studies correlating mutations and response to therapy in non-B subtypes (Martínez-Cajas et al., 2008), it is known that some clade-specific amino acids at resistance positions may influence drug susceptibility, selection of different resistance pathways, and/or a more rapid emergence of drug-resistance (Holguín et al., 2006b). Regardless of their therapeutic and epidemiological implications, these residues have been excluded in a specific list created in a positive attempt to homogenise transmitted drug-resistances detected in treatment-naïve patients (Bennett et al., 2009). However, this list only includes two of the 43 HIV-1 circulating recombinant forms described to date (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>), and should be improved to be applicable to all recombinants, that are increasing in global prevalence.

Some of these subtype-associated polymorphisms in positions related to drug-resistance are responsible for the discrepancies found in drug-resistance interpretation using different algorithms. Our study reports that when using five different algorithms discordances were significantly higher in non-B vs. B variants for didanosine, nevirapine, tipranavir, and fosamprenavir, and significantly lower for tenofovir. These discrepancies highlight that the patterns of drug-resistance mutations have not been yet completely clarified in non-B variants, especially for PI. The use of certain algorithms could lead to an overestimation of the resistance in the analysis of specific non-B subtypes because of the lack of consensus in the resistance mutations considered. Nevertheless, it does not mean that the analyzed tools are useless or that the current interpretation algorithms may be invalidated due to non-B subtypes. These algorithms are easy to use and useful in the routine practice for clinicians during the clinical follow up of their HIV-infected patients and a good concordance among them was observed for most (but not all) variants and drugs. The discrepancies between them would justify the necessity of including more samples from subtypes different from B in the databases from different algorithms to improve the excellence of the methods, reducing the potential mistakes in some non-B specimens for some drugs using specific algorithms. For instance, it would avoid interpreting as resistant a sequence which presumably is not. On the other hand, with these data we cannot affirm which of the algorithms are the most accurate. In order to clarify this aspect phenotypic assays should be performed to elucidate which algorithm is right and which is wrong.

Although discrepancies have been previously reported (Champenois et al., 2008; Kijak et al., 2003; Muñoz et al., 2005; Poonpiriya et al., 2008; Ravela et al., 2003; Snoeck et al., 2006; Vergne et al., 2006), only a few studies have compared discrepancies testing different HIV-1 subtypes and recombinants. In fact, very few studies have included different CRF ranging from 1 to 6 (Poonpiriya et al., 2008; Champenois et al., 2008; Vergne et al., 2006; Snoeck et al., 2006) whereas our work has included sequences from 11 different CRFs. Moreover, to our knowledge, no previous reports have compared as many algorithms as the present work. Some of these studies tried to correlate clade-specific substitutions and discrepancies, as previously described using ANRS algorithm for tipranavir-resistance associated with PR changes M36I, H69K and L89M (Champenois et al., 2008), which are in fact wild-type amino acid in most of the non-B variants. Our work also reports that A98S substitution, wild-type amino acid in CRF14_BG,

was interpreted as a nevirapine-resistance marker by the ANRS algorithm.

Finally, HIV-1 rapid subtyping tools can be useful for clade B identification but their efficacy is lower for other variants and differs among tools, as previously reported (Holguín et al., 2008b; Ntemgwa et al., 2008). It can be due to the fact that they assign the subtype by simply applying the similarity method. Phylogenetic analysis is still the only reliable method to correctly assign HIV-1 non-B subtypes and CRF, which are growing in number and complexity. Furthermore, this analysis is complicated to perform in the routine practice. We recommend the use of several rapid subtyping tools instead of only one, in order to compare the results. Furthermore, before entering routine clinical use, rapid subtyping tools should be optimised and updated periodically, including larger numbers of different non-B subtypes and CRF sequences in reference databases. The prediction of subtyping by these tools should be improved before being used in routine clinical settings. Thus, a common global effort is needed for the databases unification in only one rapid subtyping tool to facilitate the rapid and more correct identification of HIV-1 subtypes and CRFs.

In summary, we found a higher prevalence of drug-resistance mutations in non-B vs. B subtypes, which reinforces the need to identify HIV-1 variants in drug-resistance surveillance studies. Databases used by online genotypic resistance algorithms and subtyping tools should be optimised and updated periodically by increasing the number of non-B and CRF sequences. This would improve their suitability for the analysis of these variants before their use in routine clinical settings.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI06/0925). AH is supported by FIS and Agencia Laín Entralgo. GY is supported by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (FSE).

References

- Aggarwal, I., Smith, M., Tatt, I.D., Murad, S., Osner, N., Geretti, A.M., Easterbrook, P.J., 2006. Evidence for onward transmission of HIV-1 non-B subtype strains in the United Kingdom. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 41, 201–209.
- Agwale, S.M., Zeh, C., Paxinos, E., Odama, L., Pienazek, D., Wambebe, C., Kalish, M.L., Ziermann, R., 2006. Genotypic and phenotypic analyses of human immunodeficiency virus type 1 in antiretroviral drug-naïve Nigerian patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 22–26.
- Bennett, D.E., Camacho, R.J., Otelea, D., Kuritzkes, D.R., Fleury, H., Kiuchi, M., Heneine, W., Kantor, R., Jordan, M.R., Schapiro, J.M., Vandamme, A.M., Sandstrom, P., Boucher, C.A., van de Vijver, D., Rhee, S.Y., Liu, T.F., Pillay, D., Shafer, R.W., 2009. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS ONE* 4, e4724.
- Booth, C.L., Geretti, A.M., 2007. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1047–1056.
- Champenois, K., Bocket, L., Deuffic-Burban, S., Cotte, L., André, P., Choisy, P., Yazdanpanah, Y., 2008. Expected response to protease inhibitors of HIV-1 non-B subtype viruses according to resistance algorithms. *AIDS* 22, 1087–1089.
- de Mendoza, C., Rodríguez, C., Colomina, J., Tuset, C., García, F., Eirós, J.M., Corral, A., Leiva, P., Agüero, J., Torre-Cisneros, J., Pedreira, J., Viciano, I., del Romero, J., Sáez, A., Ortiz de Lejarazu, R., Soriano, V., 2005. Resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and prevalence of HIV type 1 non-B subtypes are increasing among persons with recent infection in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1350–1354.
- Delgado, E., Thomson, M.M., Villahermosa, M.L., Sierra, M., Ocampo, A., Miralles, C., Rodríguez-Pérez, R., Diz-Aren, J., Ojea-de Castro, R., Losada, E., Cuevas, M.T., Vázquez-de Parga, E., Carmona, R., Pérez-Alvarez, L., Medrano, L., Cuevas, L., Tabeada, J.A., Nájera, R., 2002. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29, 536–543.
- Geretti, A.M., 2007. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naïve persons. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 22–32.
- Gutiérrez, M., Tajada, P., Álvarez, A., De Julián, R., Baquero, M., Soriano, V., Holguín, A., 2004. Prevalence of HIV-1 non-B subtypes, syphilis, HTLV and Hepatitis B and C viruses among immigrant sex workers in Madrid, Spain. *J. Med. Vir.* 74, 521–527.

- Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P.D., Osmanov, S., 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20, w13–23.
- Holguín, A., Álvarez, A., Soriano, V., 2005. Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J. Med. Virol.* 75, 374–380.
- Holguín, A., Suñe, C., Hamy, F., Soriano, V., Klimkait, T., 2006a. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J. Clin. Virol.* 36, 264–271.
- Holguín, A., Ramírez de Arellano, E., Rivas, P., Soriano, V., 2006b. Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev.* 8, 98–107.
- Holguín, A., Pena, M.J., Troncoso, F., Soriano, V., 2007. Introduction of non-B subtypes among Spaniards newly diagnosed with HIV type 1 in the Canary Islands. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23, 498–502.
- Holguín, A., de Mulder, M., Yebra, G., López, M., Soriano, V., 2008a. Increase of non-B subtypes and recombinants among newly diagnosed HIV-1 native Spaniards and immigrants in Spain. *Curr. HIV Res.* 6, 327–334.
- Holguín, A., López, M., Soriano, V., 2008b. Reliability of rapid subtyping tools compared to that of phylogenetic analysis for characterization of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtypes and recombinant forms. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3896–3899.
- Johnson, V.A., Brun-Vézinet, F., Clotet, B., Gunthard, H.F., Kuritzkes, D.R., Pillay, D., Schapiro, J.M., Richman, D.D., 2008. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: spring 2008. *Top. HIV Med.* 16, 62–68.
- Kantor, R., Katzenstein, D., 2003. Polymorphism in HIV-1 non-subtype B protease and reverse transcriptase and its potential impact on drug susceptibility and drug resistance evolution. *AIDS Rev.* 5, 25–35.
- Kijak, G.H., Rubio, A.E., Pampero, S.E., Zala, C., Cahn, P., Galli, R., Montaner, J.S., Salomón, H., 2003. Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. *HIV Med.* 4, 72–78.
- Martínez-Cajas, J.L., Pant-Pai, N., Klein, M.B., Wainberg, M.A., 2008. Role of genetic diversity amongst HIV-1 non-B subtypes in drug resistance: a systematic review of virologic and biochemical evidence. *AIDS Rev.* 10, 212–223.
- Martínez-Picado, J., Gutiérrez, C., de Mendoza, C., Erkicia, I., Domingo, P., Camino, X., Galindo, M.J., Blanco, J.L., Leal, M., Masabau, A., Guelar, A., Llibre, J.M., Margall, N., Iribarren, J., Gutiérrez, S., Baldoví, J.F., Pedreira, J.D., Gatell, J.M., Moreno, S., Clotet, B., Soriano, V., Ruiz, L., 2005. Surveillance of drug resistance and HIV subtypes in newly diagnosed patients in Spain during 2004 [abstract 124]. In: 14th International HIV Drug Resistance Workshop, Quebec, Canada.
- Muñoz, M., Carmona, R., Pérez-Álvarez, L., Cilla, G., Suárez, M.D., Delgado, E., Contreras, G., Corral, J., de Goicoetxea, M.J., Medrano, L., Lezaún, M.J., Nájera, R., 2005. Analysis of discrepancies in the interpretation of antiretroviral drug resistance results in HIV-1 infected patients of Basque Country, Spain. *J. Clin. Virol.* 33, 224–229.
- Ntemgwá, M., Gill, M.J., Brenner, B.G., Moisi, D., Wainberg, M.A., 2008. Discrepancies in assignment of subtype/recombinant forms by genotyping programs for HIV type 1 drug resistance testing may falsely predict superinfection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 24, 995–1002.
- Nyombi, B.M., Holm-Hansen, C., Kristiansen, K.I., Bjune, G., Müller, F., 2008. Prevalence of reverse transcriptase and protease mutations associated with antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1 infected pregnant women in Kagera and Kilimanjaro regions, Tanzania. *AIDS Res. Ther.* 5, 13.
- Ojesina, A.I., Sankalé, J.L., Odaibo, G., Langevin, S., Meloni, S.T., Sarr, A.D., Olaleye, D., Kanki, P.J., 2006. Subtype-specific patterns in HIV Type 1 reverse transcriptase and protease in Oyo State, Nigeria: implications for drug resistance and host response. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 770–779.
- Palacios, R., Vician, I., Pérez de Pedro, I., de la Torre, J., Roperio, F., Fernández, S., Salgado, F., Roldán, J., de Dios Colmenero, J., Márquez, M., Santos, J., Grupo Malagueño para el Estudio de las Enfermedades Infecciosas, 2008. Prevalence of primary resistance mutations in patients with newly diagnosed HIV infection in the province of Málaga (Spain). *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 26, 141–145.
- Pillonel, J., Barin, F., Laperche, S., Bernillon, P., Le Vu, S., Brunet, S., Thierry, D., Desenclos, J.C., Transfusion-Transmissible Agents Working Group of the French Society of Blood Transfusion, 2008. Human immunodeficiency virus type 1 incidence among blood donors in France, 1992 through 2006: use of an immunoassay to identify recent infections. *Transfusion* 48, 1567–1575.
- Poonpiriya, V., Sungkanuparph, S., Leechnachai, P., Pasomsab, E., Watitpun, C., Chunhakan, S., Chantratita, W., 2008. A study of seven rule-based algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic resistance data in Thailand. *J. Virol. Methods* 151, 79–86.
- Ravela, J., Betts, B.J., Brun-Vézinet, F., Vandamme, A.M., Descamps, D., van Laethem, K., Smith, K., Schapiro, J.M., Winslow, D.L., Reid, C., Shafer, R.W., 2003. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33, 8–14.
- Rhee, S.Y., Fessel, W.J., Liu, T.F., Marlowe, N.M., Rowland, C.M., Rode, R.A., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., Brun-Vézinet, F., Calvez, V., Taylor, J., Hurley, L., Horberg, M., Shafer, R.W., 2009. Predictive value of HIV-1 genotypic resistance test interpretation algorithms. *J. Infect. Dis.* 200, 453–463.
- Sagir, A., Oette, M., Kaiser, R., Däumer, M., Fätkenheuer, G., Rockstroh, J.K., Knechten, H., Schmutz, G., Hower, M., Emmelkamp, J., Pfister, H., Häussinger, D., RESINA Study Team, 2007. Trends of prevalence of primary HIV drug resistance in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 843–848.
- Sanchez-Oñoro, M., López, M.J., Santana, M.A., Andrés, J.M., Campelo, F.A., 2007. Primary antiretroviral drug resistance among patients diagnosed with HIV infection in Gran Canaria (Spain) between 2002 and 2005. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 25, 437–440.
- Shet, A., Berry, L., Mohri, H., Mehandru, S., Chung, C., Kim, A., Jean-Pierre, P., Hogan, C., Simon, V., Boden, D., Markowitz, M., 2006. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 41, 439–446.
- Smith, D., Moïni, M., Pesano, R., Cachay, E., Aiem, H., Lie, Y., Richman, D., Little, S., 2007. Clinical utility of HIV standard genotyping among antiretroviral-naïve individuals with unknown duration of infection. *Clin. Infect. Dis.* 44, 456–458.
- Snoeck, J., Kantor, R., Shafer, R.W., Van Laethem, K., Deforche, K., Carvalho, A.P., Wynhoven, B., Soares, M.A., Cane, P., Clarke, J., Pillay, C., Sirivichayakul, S., Ariyoshi, K., Holguín, A., Rudich, H., Rodrigues, R., Bouzas, M.B., Brun-Vézinet, F., Reid, C., Cahn, P., Brígido, L.F., Grossman, Z., Soriano, V., Sugiura, W., Phanuphak, P., Morris, L., Weber, J., Pillay, D., Tanuri, A., Harrigan, R.P., Camacho, R., Schapiro, J.M., Katzenstein, D., Vandamme, A.M., 2006. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 694–701.
- SPREAD programme, 2008. Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes. *AIDS* 22, 625–635.
- UNAIDS Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2009. 2008 Report on the global AIDS epidemic, second electronic edition. Available at: <http://data.unaids.org/pub/GlobalReport/2008/JC1511.GR08.ExecutiveSummary.en.pdf> (23 June 2009, date last accessed).
- Vergne, L., Snoeck, J., Aghokeng, A., Maes, B., Valea, D., Delaporte, E., Vandamme, A.M., Peeters, M., Van Laethem, K., 2006. Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naïve and treated patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, 53–62.
- Vessière, A., Nerrienet, E., Kfufwah, A., Menu, E., Tejiokem, M., Pinson-Recordon, P., Barré-Sinoussi, F., Fleury, H., Ayoub, A., 2006. HIV-1 pol gene polymorphism and antiretroviral resistance mutations in drug-naïve pregnant women in Yaoundé, Cameroon. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 42, 256–258.
- Wensing, A.M., van de Vijver, D.A., Angarano, G., Asjö, B., Balotta, C., Boeri, E., Camacho, R., Chaix, M.L., Costagliola, D., De Luca, A., Derdelinckx, I., Grossman, Z., Hamouda, O., Hatzakis, A., Hemmer, R., Hoepelman, A., Horban, A., Korn, K., Kücherer, C., Leitner, T., Loveday, C., MacRae, E., Maljkovic, I., de Mendoza, C., Meyer, L., Nielsen, C., Op de Coul, E.L., Ormaasen, V., Paraskevis, D., Perrin, L., Puchhammer-Stöckl, E., Ruiz, L., Salminen, M., Schmit, J.C., Schneider, F., Schuurman, R., Soriano, V., Stanczak, G., Stanojevic, M., Vandamme, A.M., Van Laethem, K., Violin, M., Wilbe, K., Yerly, S., Zazzi, M., Boucher, C.A., SPREAD Programme, 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J. Infect. Dis.* 192, 958–966.
- Wheeler, W., Mahle, K., Bodnar, U.R., Kline, R., Hall, H.I., McKenna, M.T., 2007. Antiretroviral drug-resistance mutations and subtypes in drug-naïve persons newly diagnosed with HIV-1 infection, US, March 2003 to October 2006 [Abstract 648]. In: 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, USA.

Clinical Differences and Viral Diversity between Newly HIV Type 1-Diagnosed African and Non-African Patients in Spain (2005–2007)

Gonzalo Yebra,^{1,2} Pablo Rivas,² María Dolores Herrero,² Marisa López,² Miguel de Mulder,^{1,2}
Sabino Puente,² Germán Ramírez-Olivencia,² Vincent Soriano,² and Africa Holguín^{1,2}

Abstract

The diagnosis of HIV-1 is increasing in African-born persons residing in Europe. They present a high prevalence of HIV-1 non-B variant infections and of parasitic infections, both of which are infrequent in Western countries. Immigration favors their presence in nonendemic countries. In this study, all newly HIV-diagnosed individuals at an HIV/AIDS and Tropical Medicine reference center in Madrid from 2005 through 2007 were retrospectively studied. HIV-1 subtyping was performed in *gag*, *pol*, and *gp41* coding regions by phylogenetic analyses. The presence of other pathogens was also evaluated. Furthermore, all HIV-1-infected Africans were screened for parasitic infections. Newly diagnosed HIV-1 subjects included 90 sub-Saharan Africans and 188 non-Africans (116 Spaniards, 13 other Europeans, and 59 Latin Americans). Significantly higher numbers of HIV-1-infected Africans than non-Africans were females, acquired HIV-1 by heterosexual contact, and presented a more advanced clinical CDC stage and criteria for starting antiretroviral therapy in the first clinical visit. They predominantly carried non-B subtype infections, mainly intersubtype recombinants. Half of HIV-1-infected Africans had parasitic infections. CD4⁺ T cell counts were lower among Africans than Europeans at the time of HIV-1 diagnosis. At 12 months of follow-up after starting antiretroviral treatment, a significantly lower proportion of Africans than non-Africans achieved undetectable viremia due to their higher loss to follow-up. However, CD4⁺ T cell recovery and virological failure rates were similar. Therefore, the profile of African HIV-1-infected immigrants varies widely with respect to Spanish HIV-infected individuals. More advanced immunodeficiency and the coexistence of parasitic diseases and infections with a large diversity of HIV-1 non-B and recombinant variants are expected.

Introduction

ONE OF THE MAIN ENTRANCE POINTS of Africans into the European Union is through Spain, and in recent years there has been an increase in the number registered in our country. Most of them came from sub-Saharan Africa, which has been severely affected by the human immunodeficiency virus (HIV) pandemic and accounts for 70% of cases worldwide.¹ Furthermore, about 70% of adults and nearly 90% of children infected with HIV in the world live in this region,¹ where HIV-1 non-B subtypes and intersubtype recombinant^{2,3} variants are the most frequent strains found.⁴ Moreover, additional tropical disease infections are frequent in this population. In the past 15 years, the number of immigrants in Spain has increased dramatically,⁵ and sub-Saharan African immi-

grants make up a small, but growing percentage of the people affected by HIV/AIDS in our country.^{6,7} In 2006, nearly 21% of the new HIV-1-infected diagnoses involved foreigners, and 39.5% of these were sub-Saharan Africans.⁷ Medical management of this population represents a clinical challenge, because of both the cultural and language barriers and the special health care needs that these patients present. Most health care professionals in Spain are unfamiliar with diseases that are common in tropical environments but infrequent in Western countries, and consequently this can result in a delay in the diagnosis of some tropical pathologies or even misdiagnosis.

As has happened in other European countries^{8–11} where subtype B infections still predominate, the introduction of HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants is expected in Spain as a result of population movements from

¹HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory, Service of Microbiology, Hospital Ramón y Cajal and CIBER-ESP, Madrid, Spain.

²Service of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Madrid, Spain.

countries endemic for those variants^{12–16} such as sub-Saharan Africa.⁴ The coexistence of multiple HIV-1 non-B clades with a native B subtype involves a more heterogeneous and complex viral population as a result of recombination between these clades and/or recombinant variants.¹⁷ This relevant phenomenon has been suspected of having clinical implications,¹⁸ affecting disease progression,¹⁹ treatment efficacy,²⁰ viral load measurements,²¹ rapid subtyping tool reliability,²² and diagnostic tests.²³ In the present study, the epidemiology, differential clinical features, and genetic nature of HIV-1 variants were analyzed in a cohort of HIV-1-infected sub-Saharan Africans who were newly diagnosed during a 3-year period in a Spanish HIV/AIDS and Tropical Medicine reference center located in Madrid. A control group, consisting of all HIV-1-infected non-Africans newly diagnosed during the same period, was also included in order to compare both populations.

Materials and Methods

Study population

Patients were recruited and followed at Hospital Carlos III, an HIV/AIDS and Tropical Medicine reference center located in Madrid, Spain. Although the study was mainly focused on African patients, all newly diagnosed HIV-1 subjects over 18 years of age who attended at least once from January 2005

through December 2007 were included in the study. Demographic, clinical, and laboratory data extracted from patients' medical records are shown in Table 1. Eosinophilia, a surrogate marker of helminthic infection, was defined as an absolute eosinophil count $>0.7/\mu\text{l}$ and relative eosinophilia as $>7\%$ eosinophil and eosinophil count $<0.7/\mu\text{l}$. Elevated immunoglobulin E (IgE) was considered if $>200\text{ IU/ml}$. The patients diagnosed with HIV-1 in 2005 and 2006 who started highly active antiretroviral treatments (HAART) in their first visit to the clinic were retrospectively analyzed. CD4 counts and viral load values were evaluated at baseline and after 1 year on HAART. Finally, plasma viremia was measured using the VERSANT HIV-1 RNA bDNA v3.0 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY) and CD4⁺ lymphocyte count was performed by flow cytometry (Coulter, Barcelona, Spain).

HIV-1 and hepatitis serological diagnosis

Two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) designed with synthetic peptides or recombinant proteins were used for the detection of antibodies to HIV-1 (AxSYM, Abbot Diagnostics, Chicago, IL). Reactive samples were confirmed using an HIV-1 viral lysate Western blot (New LAV BLOT I, BIO-RAD, Marnes la Coquette, France) and a line immunoassay (LIA) able to distinguish antibodies to HIV-1 and HIV-2 (Pepti-LAV, BIO-RAD). HIV infection was considered as

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL DATA FOR NEWLY HIV DIAGNOSED SUBJECTS ACCORDING TO THEIR ORIGIN^a

	Africans	Control group (n = 188)		p
		South Americans	Europeans	
No. of patients	90	59	129	—
Age (years) [median (IQR)]	41 (31.5–49.5)	34 (27–37)	38 (32–45)	<0.001
Male gender (%)	42.2	86.4	89.1	<0.001
Perceived exposure category (%)				
MSM	1.1	75.4	64.7	<0.001
Injecting drug use	1.1	0	9.2	0.004
Heterosexual	89.9	22.8	24.4	<0.001
Other/unknown	7.9	1.8	1.7	0.025
No. CD4 count (cells/ml) [median (IQR)]	270 (146–434)	266 (171–459)	375 (220–601)	0.014
CD4 [median (IQR)] (%)	13 (9–22)	14 (9–21)	20 (13.5–30)	<0.001
Patients with $<200\text{ CD4/ml}$ (%)	37	32.7	23.2	NS
Patients with $<50\text{ CD4/ml}$ (%)	9.9	12.7	8.8	NS
Recent HIV infection (%)	4	13.2	20.5	0.002
Viral load (\log_{10} copies/ml) [median (IQR)]	4.5 (3.8–4.9)	4.6 (4.1–5.1)	4.4 (3.9–5.0)	NS
CDC stage (%)				
A	54.5	70.9	79	<0.001
B	17	12.7	10.5	NS
C	28.4	16.4	10.5	0.001
HBsAg positive (%)	5.6	3.4	4.7	NS
HCVAb positive (%)	11.1	0	10.9	0.003
Tuberculosis (%)	18.2	8.6	2.3	<0.001
Bacterial infections (%) (excluding TB)	23.8	9.1	7.2	0.001
STD (%) (excluding HPV)	10.7	21.4	14.5	NS
Syphilis (%)	7.1	14.5	12.2	NS
Protozoal or helminthic infections (%)	51.1	7	4.2	<0.001

^aIQR, interquartile range; MSM, men who have sex with men; CDC, Centers for Disease Control and Prevention; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HCVAb, hepatitis C antibodies; TB, tuberculosis; STD, sexually transmitted diseases; HPV, human papilloma virus; NS, not significant ($p > 0.05$).

recent if it happened within 12 months before HIV diagnosis, according to physicians' information. Diagnosis of hepatitis B and C was performed using serological tests (Architect, Abbott Diagnostics, Chicago, IL).

Diagnosis of other infectious diseases

All African-born patients, even if asymptomatic, were systematically screened for the following conditions by standardized techniques²⁴: stool concentrate microscopy of three different samples, day bloods, and skin snips samples for microfilariae, filarial, *Schistosoma*, and African trypanosomiasis serology. *Strongyloides*, *Toxocara*, *Equinococcus*, and *Fasciola* serology and specific IgE to *Ascaris lumbricoides* were performed in case of total or relative eosinophilia and/or elevated IgE without a diagnosis after the first screening. The study of malaria included thick blood smear and amplification of *Plasmodium* DNA by seminested multiplex polymerase chain reaction (PCR). Other investigations were performed according to any clinical suspicion in all African or non-African patients.

HIV-1 subtyping

In the African group, RNA extraction from plasma specimens, direct sequencing, and phylogenetic analyses of sequences obtained from nested PCR purified products were performed for HIV-1 subtype characterization in *gag*, *pol*, and *gp41* coding regions. In some specimens *gag* and *pol* were amplified in one amplicon (positions from 693 to 3250 in the HXB2 isolate) with outer primers 506D (5'-GGA ACC CAC TGC TTA AGC CTC AAT AAA G-3') and NE135 (5'-CTT ACT AAC TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CAG CT-3') and inner primers 693D (5'-CTC TCG ACG CAG GAC TCG GCT TGC TG-3') and RT4m (5'-AGG ATG GAG YTC ATA YCC CAT CCA AAG-3'). Conditions were incubation at 94°C for 3 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 2.30 min, with a final extension at 72°C for 10 min. The sequencing reaction used primers 693D (see above), 1309D (5'-GCA TTA TCA GAA GGA GCC ACC CCA C-3'), 1333R (5'-GTG GGG TGG CTC CTT CTG ATA ATG C-3'), RT4m (see above), and Prot4 (5'-AAT GCT TTT ATT TTT TCT TCT GTC AAT GGC-3'). When *gag* and *pol* were analyzed separately, *gag* was amplified completely (1384 bp, residues 790–2292 in HXB2) or partially (515 bp, positions 1754–2269 in HXB2) and sequenced as previously described.^{25,26} The HIV-1 *pol* sequences, including complete protease and partial reverse transcriptase (codons 1–247 or 1–335), were obtained using the Trugene (Siemens, Barcelona, Spain) or Viroseq™ HIV-1 genotyping System (Celera Diagnostic, Alameda, CA), respectively. Sequencing of *pol* was performed using the primers Prot3 (5'-TCA GAG CAG ACC AGA GCC AAC AGC CCC A-3'), RT4m (see above), and A35 (5'-TTG GTT GCA CTT TAA ATT TTC CCA TTA GTC CTA TT-3'). The complete *gp41* coding region (codons 1–345) was amplified and sequenced according to a previous report.²⁷

Phylogenetic analyses using the *gag*, *pol*, and *gp41* sequences were carried out for HIV-1 subtype or intersubtype recombinant characterization as reported,^{26,27} using as reference sequences those belonging to the HIV-1 group M available at the GenBank. All trees were rooted with the HIV-1 divergent YBF30 group N sequence. The tree topology was obtained using the neighbor-joining method, and the se-

quences were aligned using Clustal X software. The pairwise distance matrix was estimated using the Kimura two-parameter model within the DNADIST program, as implemented in the PHYLIP software package. Bootstrap resampling (1000 data sets) of the multiple alignment was performed to test the statistical robustness of the tree.

We considered as "pure" those sequences with the same nonrecombinant subtype in all the assessed regions. The recombinant variants included variants harboring the same or different CRF sequences at *gag*, *pol*, and *gp41*, as well as the HIV-1 strains carrying different clades in at least one of the regions.

Data analysis

Differences between continuous variables and correlations were analyzed using parametric and nonparametric tests. Differences between categorical variables were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test as appropriate. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Demographic, clinical, and immunological status

Two hundred and seventy-eight newly diagnosed HIV-1-infected patients were identified, 188 (67.6%) non-Africans and 90 (32.4%) Africans coming from eight different sub-Saharan countries, mainly (75) from Equatorial Guinea, a former Spanish colony located between Cameroon and Gabon. Among the HIV-1-infected non-Africans, considered as the control group, 129 were Europeans (116 native Spaniards) and 59 came from 14 South American countries. The median time from arrival of the HIV-1-infected African patients in Spain until their first visit to the clinic was 2 weeks (interquartile range: 0–14 weeks). This short period is due to the fact that several patients came to Spain specifically for treatment. Table 1 shows the main demographic and clinical data from all subjects according to their origin. Africans and Europeans showed a similar median age at HIV-1 diagnosis, which was significantly higher than in Latin Americans. More Africans than non-Africans were females (58% vs. 12%; $p < 0.001$), acquired HIV infection through heterosexual risk contacts (90% vs. 24%; $p < 0.001$), and presented a more advanced clinical CDC stage in the first visit to the clinic. At the time of HIV diagnosis 9.3% of the sub-Saharan women of childbearing age were pregnant. Gender, CDC stage, baseline viral load, or comorbidity did not differ between Latin Americans and Europeans.

The immunological status of HIV-1-infected Africans and Latin Americans was similar. They respectively presented a lower median CD4⁺ T cell count (270 and 266 vs. 375 cells/ml; $p < 0.001$) and a lower CD4 percentage (13% and 14% vs. 20%) than Europeans. Thus, Europeans had the best immunological status at their first visit. The number of Africans with cell counts less than 200 CD4 cells/ml at the first visit tended to be similar to non-Africans (37% vs. 32%). It was only significantly lower in the Europeans (37% vs. 23%; $p = 0.04$), even with similar HIV-1 viremia at baseline. The highest number of recent HIV-1 infections occurred in Europeans (20.5%) and the lowest in Africans (4%). In addition, the most prevalent AIDS-defining condition was tuberculosis, accounting for 64% of all the AIDS diagnoses in Africans compared to 27% in

non-Africans ($p = 0.008$). Other AIDS-defining diseases found among Africans were Kaposi's sarcoma in four subjects, cytomegalovirus disease in three individuals, *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, esophageal candidiasis, and cerebral toxoplasmosis, each in two patients, progressive multifocal leukoencephalopathy in one patient, and wasting syndrome due to HIV in one patient.

Concomitant infections at time of HIV-1 diagnosis

Hepatitis B virus coinfections were similar among groups (Table 1). However, no hepatitis C virus coinfection was reported among HIV-1-infected Latin Americans, probably because of the absence of intravenous drug users in this group. A similar number of Africans and Europeans presented sexually transmitted diseases (STDs) at HIV-1 diagnosis, including syphilis. However, STDs were more frequent among HIV-1-infected Latin Americans (Table 1). A higher proportion of Africans presented a bacterial infection at the time of HIV-1 diagnosis, including seven patients with urinary tract infections, four with bacterial pneumonia, three with upper respiratory tract infections, two with bacterial gastroenteritis or deep abscesses, respectively, one with acute cholangitis, and another one with acute cholecistitis.

All HIV-1-infected Africans and non-Africans with clinical suspicion of protozoal or helminthic infections were screened to rule out parasitic infections. Eosinophilia and elevated IgE were common among HIV-1-infected Africans (17% and 58%, respectively), with 29% presenting relative eosinophilia. Parasitic infections in the first visit were more frequent among HIV-1-infected Africans (51%) than non-Africans (5%) tested for a broad spectrum of parasitic infections (Table 2). Parasitic-infected Africans showed a significantly lower median CD4⁺ count at HIV diagnosis than those without evidence of infection (238 vs. 303 cells/ml; $p = 0.028$). The CD4⁺ cell count was inversely related to the number of concomitant parasitic infections ($r = -0.317$; $p = 0.005$) and directly related to total eosinophil number ($r = 0.359$; $p = 0.001$). The total and relative eosinophil and IgE numbers were significantly higher in those HIV-1-infected Africans with any helminthic disease ($p = 0.001$, $p = 0.049$, and $p = 0.009$, respectively), but only in those with more than 200 CD4 cells/ μ l.

Malaria was diagnosed in 13 HIV-1-infected Africans (14.4%): 12 infected by *P. falciparum* and one by *P. malariae*. They presented significantly higher HIV-1 viremia (4.9 vs. 4.2 logs; $p = 0.037$) and lower CD4 cells (245 vs. 285; $p = 0.1$) than those without malaria. In six patients a positive malaria diagnosis was made by a positive PCR test and negative thick blood smear, even though the patients were asymptomatic or referred only to mild unspecific symptoms. Their viral load was significantly higher (5 vs. 4.2 logs; $p = 0.002$) and their CD4 cells count tended to be lower (252 vs. 291; $p = 0.081$) than those without malaria.

Response to HAART in HIV-1-infected Africans vs. non-Africans

More Africans than non-Africans presented criteria to start HAART at the first visit (72% vs. 56%; $p = 0.024$). Eventually, in 2005 and 2006, 61 non-Africans and 29 Africans started HAART, including protease inhibitors in 60.7% and 46.5%, respectively. At 1 year of follow-up after starting HAART, a significantly lower proportion of Africans achieved a viral

TABLE 2. ASSOCIATED PROTOZOAL AND HELMINTHIC INFECTIONS IN 90 NEWLY HIV-1-INFECTED AFRICANS

Diagnoses	No.	% ^a
Protozoos		
Malaria	13	14.4
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	4	4.4
<i>Giardia lamblia</i>	4	4.4
<i>Trypanosoma brucei</i>	1	1.1
Helminths		
<i>Schistosoma</i> sp.	3	3.3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	11	12.2
<i>Trichuris trichiura</i>	7	7.7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3	3.3
Hookworm	1	1.1
<i>Toxocara</i> sp.	1	1.1
<i>Taenia solium/cisticercosis</i>	1	1.1
<i>Mansonella perstans</i>	5	5.5
<i>Oncocerca volvulus</i>	3	3.3
<i>Loa loa</i>	2	2.2
Any parasitic infection	46	51.1

^aAmong the parasitic-infected Africans, 69% presented one pathogen, 26% two, and 5% three or more parasitic infections at HIV diagnosis.

load below 50 HIV RNA copies/ml (41.4% vs. 82%; $p < 0.001$). A similar median CD4⁺ count increment was observed among those Africans vs. non-Africans who achieved an undetectable viral load after 1 year of treatment (251 vs. 215 cells/ml; $p = 0.20$). Africans presented a significantly higher proportion of loss to follow-up than the non-Africans (41.4% vs. 11.5%; $p < 0.001$), but both groups showed similar rates of virological failure (18.5% vs. 6.6%; $p = 0.11$). Four out of the five virological failures observed in Africans were associated with a transient lack of antiretroviral treatment during short visits to their countries.

HIV-1 variants infecting newly diagnosed HIV-1 patients

Table 3 shows the number and percentage of patients carrying different subtypes and recombinant viruses. HIV-1 subtyping could be performed in any region in 73% and 66.5% of viruses from Africans and non-Africans, respectively. The rest could not be determined because of failures of PCR amplification (probably due to genetic heterogeneity) or to a lack of plasma samples (Table 4). The nature and the GenBank accession number of all generated sequences are shown in Table 4. The rate of HIV-1 non-B subtypes and recombinants among Africans was extremely high compared to the control group (97% vs. 8.8%) (Table 3). In Africans, CRF02_AG recombinants were the most frequently found variant and unique recombinant forms (URF) caused nearly 40% of recombinant infections. Considering the three different coding regions, nearly 80% of Africans carried HIV-1 variants including recombinant sequences at *gag* (72%), *pol* (71.4%), and *gp41* (78.4%). In contrast, HIV-1 recombinants at *pol* were present only in 5.6% of HIV-1-infected non-Africans. "Pure" non-B HIV-1 viruses, carrying the same non-B subtype in all analyzed regions, infected 18.2% of Africans and 3.2% of non-Africans (Table 3). Subtype B was the most frequent HIV-1 variant found (91.2%) among non-Africans. Only 11 non-Africans (two Spaniards) carried non-B sequences at

TABLE 3. HIV-1 VARIANTS AMONG NEWLY HIV DIAGNOSED SUBJECTS WITH AVAILABLE SUBTYPE ACCORDING TO THEIR ORIGIN^a

HIV-1 variant (gag/pol/env)	% of HIV-1 subtyped subjects			
	Control group (n = 125)			p
	Africans (n = 66)	South Americans (n = 39)	Europeans (n = 86)	
Subtype B	3 (2/66)	92 (36/39)	91 (78/86)	<0.001
Non-B subtypes and intersubtype recombinants	97 (64/66)	8 (3/39)	9 (8/86)	<0.001
“Pure” non-B subtypes	18 (12/66)	0 (0/39)	5 (4/86)	<0.001
Recombinant forms (CRF + URF)	79 (52/66)	8 (3/39)	5 (4/86)	<0.001
CRF	61 (32/52)	100 (3/3)	75 (3/4)	NS
URF	38 (20/52)	0 (0/3)	25 (1/4)	NS

^aNon-B subtypes and intersubtype recombinants include all the variants not ascribed to subtype B. Among them, two categories can be distinguished: pure non-B and recombinant non-B. We considered as “pure” non-B subtypes those presenting the same non-B subtype in all the regions analyzed. Recombinant forms are those with different subtypes or the same recombinant sequence in any region. At the same time, recombinants can be subdivided into CRF (circulating recombinant forms) and URF (unique recombinant forms); NS, not significant ($p > 0.05$).

pol (1A, 1C, 2G, 1CRF01_AE, 1CRF02_AG, 1CRF10_CD, 2CRF12_BF, and 2CRF31_BC), mostly in subjects coming from regions where those variants circulate or having risk contact with natives from those areas.^{28,29} Further analysis in *gag* and *gp41* revealed the complex nature of the CRF10_CD specimen from a Spanish female infected by her Kenyan partner, and this was redefined as a URF: outgroup^{gag}/CRF10_CD^{pol}/A^{gp41}.

Discussion

In the present study we compared clinical and epidemiological characteristics and HIV-1 variants in a large cohort of newly diagnosed HIV-1-infected Africans vs. non-Africans during a 3-year period. A significantly increasing number of immigrants has continuously arrived in Spain in the last 15 years. However, their clinical characteristics have received little attention. In addition, HIV-1 subjects coming from developing countries can present endemic infections not commonly found in Western countries, thus complicating their clinical management.

In 2002, the HIV-1 prevalence among African immigrants in Spain was 5.4%.⁶ Since then the diagnosis of the disease has been increasing in African-born persons in Spain, as has occurred in other European countries and in the United States.^{30,31} As we confirmed in the non-African group, subtype B is the most prevalent HIV-1 variant in developed regions, including Spain.^{15,16} However, new variants are being introduced through immigration,^{8–18} changing the HIV-1 molecular epidemiology in the host countries. In Europe, a relatively high and increasing non-B variant prevalence (from 15% to nearly 50%) has been documented among newly diagnosed HIV-1 cases in natives and immigrants.^{8,10,11} Focusing on Spain, a gate of entrance of Africans into Europe, non-B viruses are currently about 10–15% of HIV-1 infections, but they are on the rise, mainly due to the increasing number of sub-Saharan migrants in recent years.^{15,16} In our study, recombinants caused 79% of 75 new non-B infections diagnosed in Spain from 2005 through 2007. Moreover, this important rate would probably be higher if other viral regions not analyzed in our study were assessed in phylogenetic analysis.

It is necessary to mention that identification of HIV-1 non-B subtypes and recombinants could have an impact on the clinical outcome. Natural polymorphisms in HIV-1 protease

and reverse transcriptase, targets of antiretrovirals, are often present in these variants at positions associated with drug resistance in subtype B. These may accelerate or modify the pathways of drug resistance emergence according to the HIV-1 clade.²⁵ However, in our study the virological and immunological response to HAART was similar in all groups during 1 year of treatment, as previously reported.^{20,32} Long-term monitoring of larger cohorts each carrying different variants will be required to find differences in response to specific drugs for each variant.

In contrast to the general European epidemic, women constituted a high proportion of newly diagnosed HIV-1 patients among African immigrants in Spain, as occurs in Africa, where almost 61% of HIV-1-infected adults in 2007 were females.¹ Moreover, a significant number of them were diagnosed with HIV-1 during pregnancy, as happened in other series,³⁰ highlighting the importance of antenatal HIV testing to reduce vertical transmission. HIV-1 homosexual transmission was uncommon among new HIV-1 diagnoses in Africans vs. non-Africans.

Nearly a third of foreigners (Africans and Latin Americans) presented with a count of fewer than 200 CD4 cells at diagnosis, suggesting long-term infection before HIV-1 diagnosis. We can suspect a longer infection time among Africans than Latin Americans considering the more advanced CDC stage (as previously reported^{30,31}) and the lower number of observed recent HIV-1 infections. Thus, it is fundamental that health educational programs are started both in developing regions and among immigrant communities in Western countries to increase the awareness about HIV infection and treatment resources and to reduce the stigma associated with HIV or the misperception of disease risk.³¹ Access to and linkage of care for persons undergoing treatment must be ensured.

Tuberculosis, the leading cause of death among people with HIV infection worldwide,³³ was the most common opportunistic infection in our series of African immigrants. Helminthic and protozoal infections were highly prevalent among newly HIV-diagnosed Africans, mainly in those with deeper immunosuppression. Other asymptomatic but relevant conditions found in HIV-infected Africans were filariasis, strongyloidiasis, and schistosomiasis. Our data support the need for evaluation of parasitic infection in HIV-1-infected African immigrants, even though absolute or relative eosinophilia is not present. Moreover, it emphasizes the necessity

TABLE 4. CHARACTERIZATION OF THE HIV-1 VARIANTS INFECTING THE AFRICAN GROUP AND ACCESSION NUMBER OF THE ANALYZED SEQUENCES^a

No.	Country of origin	HIV-1 subtype			GenBank accession numbers		
		gag	pol (PR/RT)	gp41	gag	pol (PR/RT)	gp41
1	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	URF(A)	EU342785	EU255308	EU342828
2	EG	C	C/C	C	EU342786	EU255465/255476	EU342829
3	EG	A	A/A	URF(A)	EU342787	EU255375	EU342830
4	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342789	EU255376	EU342832
5	EG	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx	EU342790	EU255378	EU342833
6	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342791	EU255468	EU342834
7	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342792	EU255379	EU342835
8	EG	F2	F2/F2	F2	EU342793	EU255380	EU342836
9	EG	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx	EU342794	EU255381	EU342837
10	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342795	EU255382	EU342838
11	EG	Neg	H/H	Neg	—	EU255383	—
12	EG	A	CRF01_AE	A	EU342796	EU255384	EU342839
13	Nigeria	G	G/G	G	EU342797	EU255391	EU342840
14	Kenya	URF	CRF10_CD	A	EU342798	EU255389	EU342841
15	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342800	EU255385	EU342843
16	EG	C	C/C	C	EU342802	EU362922	EU342846
17	EG	Neg	CRF10_CD	D	—	EU342817	AY751065
18	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342803	EU255388	EU342848
19	EG	n.d.	Neg	CRF02_AG	—	—	EU342849
20	EG	CRF11_cpx	CRF11_cpx	CRF11_cpx	EU342806	EU342806	—
21	EG	n.d.	Neg	B	—	—	EU362925
22	EG	URF	C/C	CRF02_AG	EU342807	EU255386	EU342853
23	EG	CRF22_01A1	CRF22_01A1	CRF22_01A1	EU342808	EU342808	—
24	EG	Neg	CRF02_AG	CRF02_AG	—	EU342822	EU342855
25	Nigeria	n.d.	G/G	CRF14_BG	—	EU342823	EU342856
26	EG	Neg	CRF11_cpx	URF	—	EU342825	EU342858
27	EG	CRF06_cpx	CRF06_cpx	CRF02_AG	EU342809	EU255507	EU342859
28	EG	Neg	C/C	URF	—	EU255513	EU342860
29	EG	Neg	A/A	URF	—	EU342826	EU342861
30	EG	n.d.	CRF02_AG	CRF02_AG	—	EU255524	EU342862
31	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342810	EU342810	—
32	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342811	EU255522	EU342865
33	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342812	EU255530	EU342866
34	EG	Neg	URF	URF	—	EU255373	EU342867
35	EG	CRF02_AG	CRF02_AG	CRF02_AG	EU342813	EU255529	EU342868
36	EG	Neg	CRF11_cpx	URF	—	EU255525	EU342870
37	EG	A	Neg	URF	EU342815	—	EU342871
38	DRC	Neg	CRF11_cpx	URF	—	EU255510	EU342872
39	EG	n.d.	G/G	n.d.	—	EU362924	—
40	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255527	—
41	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU362923	—
42	Nigeria	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU342827	—
43	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU545186	—
44	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU362926	—
45	EG	n.d.	URF(D)	n.d.	—	EU362927	—
46	EG	n.d.	URF(02/06)	n.d.	—	EU362928	—
47	EG	n.d.	URF(A/01)	n.d.	—	EU545187	—
48	EG	n.d.	URF(02/06)	n.d.	—	EU545188	—
49	IC	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU545189	—
50	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255355	—
51	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU545190	—
52	EG	n.d.	F2	n.d.	—	EU545191	—
53	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255307	—
54	EG	n.d.	G	n.d.	—	EU545192	—
55	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255360	—
56	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255309	—
57	Cameroon	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255528	—
58	EG	n.d.	G	n.d.	—	EU545193	—
59	EG	n.d.	A	n.d.	—	EU545194	—
60	EG	n.d.	G	n.d.	—	EU255342	—
61	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU255354	—

(Continued)

TABLE 4. (CONTINUED)

No.	Country of origin	HIV-1 subtype			GenBank accession numbers		
		gag	pol (PR/RT)	gp41	gag	pol (PR/RT)	gp41
62	EG	n.d.	URF (G/02)	n.d.	—	EU255358	—
63	GB	n.d.	B	n.d.	—	EU552227	—
64	EG	n.d.	CRF02_AG	n.d.	—	EU552228	—
65	Nigeria	n.d.	CRF06_cpx	n.d.	—	EU529856	—
66	Nigeria	n.d.	G	n.d.	—	EU255477	—

^aURF, unique recombinant form; CRF, circulating recombinant form; EG, Equatorial Guinea; GB, Guinea-Bissau; DRC, Democratic Republic of the Congo; IC, Ivory Coast; Neg, PCR negative; n.d., not determined due to lack of sample.

of increasing awareness among clinicians regarding the occurrence of these parasites in this population.

Malaria is, together with HIV and tuberculosis, the most important pathogen that is currently devastating the tropics. Complex bidirectional interactions between infection with *P. falciparum* and HIV have been found. Malaria has been associated with a transitory higher viral load and lower CD4 counts³⁴ and could increment HIV replication, accelerating the course of HIV disease.³⁵ In contrast, HIV infection appears to increase only modestly the risk of parasitemia and clinical malaria in semiimmune adults in regions of stable and heavy transmission.³⁵ A high rate of asymptomatic malaria, detectable only by molecular techniques, was found as most of our HIV-1-infected Africans came from West African regions of stable malaria transmission. Acquired immunity plays an important role in the clearance of parasites and severe immunosuppression might facilitate the persistence of malaria. As malaria is common in recent HIV-infected African immigrants, efforts should be taken for its diagnosis and treatment, particularly in the most severely immunosuppressed subjects.

A limitation of our study is that most of our HIV-1 Africans came from Central-Western Africa. A longer-term follow-up is also necessary. The profile of sub-Saharan HIV-infected immigrants varies widely from that of the usual HIV-infected individuals in Spain. Regarding the HIV-1 diversity, the study would be more accurate if non-Africans were further analyzed in other genetic regions. It would probably be useful to detect the heterogeneity we cannot perceive with only *pol* analysis. Finally, more advanced immunodeficiency, the coexistence of parasitic diseases, and infections with a large diversity of HIV-1 non-B and recombinant variants are expected.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from Red de Investigación en SIDA (RIS, project ISCIII-RETIC RD06/006) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI06/0925). A.H. and V.S. are supported by FIS and Agencia Laín Entralgo. G.Y. is supported by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid and Fondo Social Europeo (FSE).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. AIDS Epidemic Update, December 2007: Available at <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdArchive/2007/>.
2. Peeters M, Toure-Kane C, and Nkengasong JN: Genetic diversity of HIV in Africa: Impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003;18:2547–2560.
3. Leitner T, Korber BT, and Daniels M: HIV-1 subtype and circulating recombinant form (CRF) reference sequences, 2005. In: *HIV Sequence Compendium 2005* (Leitner T, Foley B, Hahn B, *et al.*, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 06-0680.
4. Los Alamos National Laboratory: Circulating recombinant forms (CRFs). Available at <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
5. Secretaría de Estado de inmigración y emigración. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, España. September 30th, 2007.
6. Castilla J, Sobrino P, and Del Amo J: HIV infection among people of foreign origin voluntarily tested in Spain. A comparison with national subjects. *Sex Transm Infect* 2002; 4:250–254.
7. Vigilancia Epidemiológica del SIDA en España: Registro Nacional de casos de SIDA. 30th June 2007. Informe Semestral no. 1, Año 2007.
8. Yirell DL, Shaw L, Campbell E, *et al.*: HIV subtypes in Scotland, 2000–2006. *Epidemiol Infect* 2007;135:1–7.
9. Thomson MM and Najera R: Increasing HIV-1 genetic diversity in Europe. *J Infect Dis* 2007;8:1120–1124.
10. Tatt ID, Barlow KL, Clewley JP, Gill ON, and Parry JV: Surveillance of HIV-1 subtypes among heterosexuals in England and Wales, 1997–2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;5:1092–1099.
11. Booth CL, Garcia-Diaz AM, Youle MS, *et al.*: Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007;3:517–524.
12. Holguín A, Álvarez A, Pena MJ, *et al.*: HIV-positive immigrants in the Canary Islands, Spain: Implications for public health in Europe. *HIV Clin Trials* 2003;3:184–192.
13. Holguín A, Álvarez A, and Soriano V: High prevalence of HIV-1 subtype G and natural polymorphisms at the protease gene among HIV-infected immigrants in Madrid. *AIDS* 2002;8:1163–1170.
14. Holguín A, Álvarez A, and Soriano V: Heterogeneous nature of HIV-1 recombinants spreading in Spain. *J Med Virol* 2005;3:374–380.
15. Holguín A, Pena MJ, Troncoso F, *et al.*: Introduction of non-B subtypes among Spaniards newly diagnosed with HIV type 1 in the Canary Islands. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;4:498–502.
16. Lospitao E, Álvarez A, Soriano V, *et al.*: HIV-1 subtypes in Spain: A retrospective analysis from 1995 to 2003. *HIV Med* 2005;5:313–320.

17. Jetzt AE, Yu H, Klarmann GJ, *et al.*: High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 2000;3:1234–1240.
18. Geretti AM: HIV-1 subtypes: Epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 2006;1:1–7.
19. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, *et al.*: HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* 2007;8:1177–1180.
20. Holguín A, Ramírez E, Rivas P, *et al.*: Efficacy of antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1 non-B subtypes. *AIDS Rev* 2006;2:98–107.
21. Rouet F, Chaix ML, Nerrienet E, *et al.*: Impact of HIV-1 genetic diversity on plasma HIV-1 RNA quantification: Usefulness of the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA second-generation long terminal repeat-based real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction test. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;4:380–388.
22. Holguín A, López M, and Soriano V: Reliability of rapid subtyping tools compared to phylogenetic analysis for characterisation of HIV-1 non-B subtypes and recombinant forms. *J Clin Microbiol* 2008;46:3896–3899.
23. Baldrich-Rubio E, Anagonou S, Stirrups K, *et al.*: A complex human immunodeficiency virus type 1 A/G/J recombinant virus isolated from a seronegative patient with AIDS from Benin, West Africa. *J Gen Virol* 2001;5:1095–1106.
24. Whetham J, Day JN, Armstrong M, *et al.*: Investigation of tropical eosinophilia; assessing a strategy based on geographical area. *J Infect* 2003;3:180–185.
25. Mammano F, Petit C, and Clavel F: Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: Phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. *J Virol* 1998;9:7632–7637.
26. Holguín A, Álvarez A, and Soriano V: Differences in the length of gag proteins among different HIV type 1 subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;10:886–893.
27. Holguín A, Faudon JL, Labernardière JL, *et al.*: Susceptibility of HIV-1 non-B subtypes and recombinant variants to enfuvirtide. *J Clin Virol* 2007;38:176–180.
28. Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, *et al.*: Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;3:328–333.
29. Carrión G, Eyzaguirre L, Montano SM, *et al.*: Documentation of subtype C HIV type 1 strains in Argentina, Paraguay, and Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;9:1022–1025.
30. Staehelin C, Rickenbach M, Low N, *et al.*: Migrants from Sub-Saharan Africa in the Swiss HIV Cohort Study: Access to antiretroviral therapy, disease progression and survival. *AIDS* 2003;15:2237–2244.
31. Akinsete OO, Sides T, Hirigoyen D, *et al.*: Demographic, clinical, and virologic characteristics of African-born persons with HIV/AIDS in a Minnesota hospital. *AIDS Patient Care STDS* 2007;5:356–365.
32. De Arellano ER, Benito JM, Soriano V, *et al.*: Impact of ethnicity and HIV type 1 subtype on response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;7:891–894.
33. Harries AD, Hargreaves NJ, Kemp J, *et al.*: Deaths from tuberculosis in sub-Saharan African countries with a high prevalence of HIV-1. *Lancet* 2001;9267:1519–1523.
34. Herrero MD, Rivas P, Rallón NI, *et al.*: HIV and malaria. *AIDS Rev* 2007;2:88–98.
35. Karp CL and Auwaerter PG: Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. *Clin Infect Dis* 2007;9:1208–1213.

Address reprint requests to:

Africa Holguín
HIV-1 Molecular Epidemiology Laboratory
Department of Microbiology
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Ctra. Colmenar Viejo km. 9,100
28034 Madrid, Spain

E-mail: aholguin.hcii@salud.madrid.org